UMWELTABHÄNGIGE UND GENETISCHE VARIATIONEN DER FARBSTOFFSENSIBILISIERTEN PHOTODYNAMISCHEN INAKTIVIERUNG VON VIER SACCHAROMYCES-STÄMMEN MIT THIOPYRONIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl.-Biol. Ursula Zimny-Arndt
aus Hannover

1985

UNIV. LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549620_0002

UMWELTABHÄNGIGE UND GENETISCHE VARIATIONEN DER FARBSTOFFSENSIBILISIERTEN PHOTODYNAMISCHEN INAKTIVIERUNG VON VIER SACCHAROMYCES-STÄMMEN MIT THIOPYRONIN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl.-Biol. Ursula Zimny-Arndt
aus Hannover

Referent: Professor Dr. W. Laskowski
Korreferent: Professor Dr. E.-R. Lochmann

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27. 3. 1985

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Charakterisierung des photodynamischen Effekts	1
1.2.	Kurze Übersicht über den physiko-chemischen Wirkmechanismus des photodynamischen Effekts	2
1.3.	Zum Wirkmechanismus der farbstoffsensibilisierenden Inaktivierung mit Thiopyronin	6
1.4.	Zur biologischen Wirkung des photodynamischen Effekts	8
1.5.	Problemstellung	11
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Saccharomyces-Stämme	15
2.1.1.	Beschreibung der Stämme	15
2.1.2.	Aufbewahrung und Reinhaltung der Stämme	16
2.2.	Substanzen	17
2.2.1.	Medien und Puffer	17
2.2.2.	Thiopyronin (TP)	19
2.3.	Bestrahlungsquellen	21
2.4.	Anzucht der Kulturen	21
2.5.	Versuchsdurchführung	22
2.5.1.	Suspensionsgewinnung	22
2.5.2.	Inkubationsbedingungen	22
2.5.3.	Inaktivierungsversuche	23
2.5.4.	Wachstumskurven	24
2.5.5.	TP-Aufnahmeversuche	24
2.5.6.	Induktion von Atmungsdefizienten	25
2.5.7.	Mutationsversuche	26
2.6.	Genetische Analysen	28
2.6.1.	Kreuzung von Haplonten	28
2.6.2.	Massensporulation	29
2.6.3.	Bestimmung der Atmungsfähigkeit	31
2.6.4.	Paarungstyp-Bestimmung	31
2.6.5.	Test zur Bestimmung der photodynamischen Sensibilität	31

Seite

2.7. Versuchsauswertung und graphische Darstellung 32
2.7.1. Auswertung der Inaktivierungsexperimente 32
2.7.2. Bestimmung der Induktionsrate an Atmungsdefizienten 33
2.7.3. Bestimmung der TP-induzierten Mutationsrate 34
2.7.3.1. Mutationsfrequenz 35
2.7.3.2. Mutantenertrag 35

3. ERGEBNISSE 37
3.1. Die photodynamische Sensibilität der Stämme 37
3.2. Einfluß unterschiedlicher Vorkulturbedingungen auf die photodynamische Sensibilität der Stämme 40
3.2.1. Problemstellung 40
3.2.2. Photodynamische Sensibilität der Stämme nach Variation der Glucose-Konzentration im Vorkulturmedium 43
3.2.3. Photodynamische Sensibilität nach Stamm-Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen 48
3.2.4. Abhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung vom pH-Wert des Suspensionspuffers 53
3.2.5. Einfluß von Atmung und Gärung auf die photodynamische Sensibilisierung 57
3.2.6. Aufnahme von TP-H^3 in Abhängigkeit von aeroben und anaeroben Vorkulturbedingungen 61
3.3. Einfluß cytoplasmatischer Bestandteile auf die photodynamische Sensibilität der Stämme 65
3.3.1. Problemstellung 65
3.3.2. Sensibilitätsvergleich bei rho^+- und rho^--Stämmen nach photodynamischer Behandlung 67
3.3.3. Untersuchungen zum Einfluß spontaner und induzierter Atmungsdefizienz auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit der Stämme 71
3.3.4. Induktion cytoplasmatischer rho^--Mutanten nach photodynamischer Behandlung 78
3.3.5. Einfluß der Vorkultur auf die Induktion cytoplasmatischer rho^--Mutationen nach photodynamischer Behandlung mit TP 83
3.4. Einfluß des Genoms auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit der Stämme 90

Seite

3.4.1. Problemstellung 90

3.4.2. Einfluß verschiedener Genotypen auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit 92

3.4.2.1. Vergleich von TP-H^3 Aufnahmekinetiken 95

3.4.3. Einfluß verschiedener Aminosäurebedürftigkeiten auf die photodynamische Sensibilität 97

3.4.4. Untersuchungen zum Erbgang photodynamischer Sensibilität 99

3.4.5. Einfluß der rad-Gene auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten 103

3.4.6. Induktion von Genmutationen nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin 108

3.4.7. Einfluß der Vorkultur auf das Mutationsverhalten nach photodynamischer Behandlung mit TP 111

3.4.8. Mutationsverhalten von atmungsdefizienten Saccharomyces-Stämmen nach photodynamischer Behandlung mit TP 118

3.5. Umwelt, Cytoplasma, Genom - Ergebnisse der 3-Faktoren-Wirkung auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten 129

4. DISKUSSION 136

4.1. Zur Interpretation photodynamischer Versuchsergebnisse 136

4.1.1. Die photodynamische Inaktivierung biologischer Systeme, eine multifaktorielle Schadenssetzung 137

4.1.1.1. Faktoren, die den photochemischen Reaktionsverlauf steuern 138

4.1.1.2. Die Bedeutung der Farbstoff-Substrat-Bindungen für das photodynamische Inaktivierungsgeschehen 140

4.2. Umweltabhängige Modifikationen der Zellphysiologie als Ursache für photodynamische Sensibilitätsschwankungen 141

4.3. Cytogenetische Faktoren, die das photodynamische Sensibilitätsverhalten beeinflussen 149

4.4. Kontrollieren nukleare Gene das photodynamische Sensibilitätsverhalten? 159

4.4.1. Photodynamische Sensibilitätsunterschiede zwischen den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM 160

4.4.2. Photodynamische Sensibilitätsunterschiede zwischen strahlenresistenten RAD- und strahlensensiblen rad-Stämmen 165

Seite

5. ZUSAMMENFASSUNG 174

6. LITERATURVERZEICHNIS 179

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1. Charakterisierung des photodynamischen Effekts

Die Energie des sichtbaren Lichts kann in der Natur in vielfacher Weise in einer für die Zelle positiven energiebringenden Reaktion genutzt werden, sofern die Zelle spezielle Substanzen besitzt, die die Energie des Lichts absorbieren. Es handelt sich hierbei um zelleigene Farbstoffe, zu denen auch das uns allen bekannte Chlorophyll zählt. Vom Farbstoff absorbiert, wird die Energie des sichtbaren Lichts von anderen Zellbestandteilen in chemische Energie umgesetzt, die der Zelle jederzeit zur Verfügung steht. Lebensvorgänge wie die Photosynthese, die Photoreaktivierung oder der Sehvorgang sind ein Beispiel für die funktionelle Wirkungsweise von zellulären Farbstoffen und sichtbarem Licht.

Demgegenüber tritt häufig eine zerstörende Wirkung des sichtbaren Lichts ein, wenn in der Zelle zusätzliche, nicht natürlich vorkommende, zellfremde Farbstoffe vorhanden sind. Auf diese Inaktivierung biologischer Vorgänge durch Farbstoffe wurde man zum ersten Mal Ende des vorigen Jahrhunderts aufmerksam (MARCACCI, 1888). Etwas später wurde dieses Phänomen als "photodynamische Erscheinung" beschrieben (RAAB, 1900; v. TAPPEINER and JODLBAUER, 1907). Heute bezeichnet man die inaktivierende Wirkung auf Zellbestandteile, hervorgerufen durch nicht-physiologische Substanzen, sogenannte Photosensibilatoren, die nach Absorption von Strahlung im sichtbaren Bereich (320 nm - 700 nm) photodynamisch aktiv sind, als "photodynamischen Effekt". Nach dieser Definition wirken Farbstoff oder Licht allein nicht inaktivierend.

Die fast 100-jährige Forschung auf dem Gebiet des photodynamischen Effekts - im weiteren durch die Buchstabenfolge PDE gekennzeichnet - hat eine umfangreiche Literatur hervorgebracht. Arbeiten, die eine Übersicht über den Kenntnisstand auf diesem Forschungsgebiet bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt

geben, sind u.a.: BLUM, 1941; SANTAMARIA, 1960; SPIKES and STRAIGHT, 1967; SPIKES, 1968; SPIKES and LIVINGSTON, 1969; LOCHMANN and MICHELER, 1973; LÜBER and KITTLER, 1976.

Untersucht wurde vor allem die inaktivierende Wirkung verschiedener Farbstoffe in Verbindung mit Strahlen unterschiedlicher Wellenlängen auf den Gesamtorganismus oder auf einzelne Zellbestandteile und Moleküle. Die gewonnenen Forschungsergebnisse trugen zum Verständnis des Wirkmechanismus des PDE bei, und man erkannte verschiedene Arten photodynamischer Inaktivierung. Die farbstoffsensibilisierte, Sauerstoff verbrauchende Photooxidation galt einigen Wissenschaftlern als eigentlicher photodynamischer Effekt (BLUM, 1941; SPIKES, 1968).

Zu den sauerstoffabhängigen Farbstoffen gehören u.a.Thioxanthen, Thiazin, Acridin, Oxazin, Pyronin, Methylenblau, Proflavin und auch Thiopyronin, das in den photodynamischen Versuchen der vorliegenden Arbeit Verwendung findet. Die von dieser Farbstoffklasse absorbierten Wellenlängen stammen aus dem sichtbaren Bereich. Als inaktivierende Strahlenquelle genügt demzufolge eine einfache Glühbirne.

1.2. Kurze Übersicht über den physiko-chemischen Wirkmechanismus des photodynamischen Effekts

Voraussetzung für eine photodynamische Inaktivierung ist bei fast allen Farbstoffen das Eindringen in die Zelle, die Bindung an Zellkomponenten und die anschließende Absorption bestimmter Lichtquanten. Die Übertragung der Lichtenergie durch den Farbstoff auf Zellbestandteile und die daraus resultierende Schädigung lebenswichtiger Zellkomponenten wird als "Hellwirkung" oder "physiko-chemischer Mechanismus" bezeichnet.

Alle Theorien über den physiko-chemischen Wirkmechanismus des PDE gehen davon aus, daß der Farbstoff im ersten Reaktions-

schritt durch ein von ihm absorbierten Photon vom Grundzustand, dem sogenannten Singlett-Zustand, bezeichnet als S_0, in einen angeregten Singlett-Zustand, dem S_1-Zustand, überführt wird, d.h. durch die absorbierte Energie des Lichtquants wird ein π-Elektron des Farbstoffs von einem gefüllten Orbital in ein energiereicheres, ungefülltes Orbital gehoben. Der S_1-Zustand dauert nur 10^{-8} - 10^{-9} sec. Danach kann der auf diese Weise angeregte Farbstoff durch Transition, also durch Umkehrung des Elektronenspins, in den ca. 10^{-6} sec dauernden und für die photochemische Reaktion notwendigen Triplett-Zustand, bezeichnet als T_0, überführt werden (Mc GLYNN et al., 1964; CHAMBERS and KEARNS, 1969; SONG and KURTIN, 1969).

$$S_0 + h\nu \rightleftharpoons S_1 \longrightarrow T_0$$

Durch den angeregten Farbstoff im Zustand eines Triplettmoleküls können Zellbestandteile photooxidiert werden.

Gemäß dem ersten Reaktionspartner des angeregten Farbstoffs unterscheidet man zwei Grundtypen photochemischer Reaktionen:

a) den radikalischen Mechanismus (Typ I)
b) den Singlett-Oxigen Mechanismus (Typ II).

Die nachfolgend entworfenen Reaktionsschemata stellen auf vereinfachte Art den Verlauf einer radikalischen photochemischen Reaktion dar:

I.

$$F + h_\nu \rightleftharpoons {}^1F \rightarrow {}^3F \qquad (1)$$
$$^3F \longrightarrow F$$

$$^3F + Z \longrightarrow (F...Z)^* \qquad (2)$$

$$(F...Z)^* + O_2 \longrightarrow F + \text{Produkt} \qquad (3)$$

Zellbestandteil (Z) und Farbstoff im Triplett-Zustand (^3F) bilden einen angeregten Komplex $(F...Z)^*$ gemäß Reaktionsschema (2), der anschließend mit Sauerstoff reagieren kann

(3) (KNOWLES and MAUTNER, 1972). Im gleichen Maße kann die Energie in Form angeregter Elektronen auf zelleigene Moleküle übertragen werden, wodurch diese reduziert und der Farbstoff oxidiert werden (KEPKA and GROSSWEINER, 1971):

$$^3F + Z \xrightarrow{e^-} F_{ox} + Z_{red} \qquad (4)$$

Andererseits können Zellbestandteile durch den angeregten Farbstoff oxidiert werden, wie aus Schema 5 ersichtlich.

$$^3F + ZH_2 \longrightarrow \dot{F}H + \dot{Z}H \qquad (5)$$

$$\dot{Z}H + O_2 \longrightarrow \text{Produkt} \qquad (6)$$

$$\dot{F}H + O_2 \longrightarrow F \qquad (7)$$

Bei diesem als Wasserstoffabstraktions-Reaktion bezeichneten Reaktionstyp entstehen häufig Paare sehr reaktionsfähiger Monoradikale, bestehend aus dem reduzierten Farbstoffradikal und dem oxidierten Substratradikal (5) (BAUGH et al., 1966; GOLLMICK and BERG, 1968; CHRYSOCHOOS and GROSSWEINER, 1968). Der Sauerstoff dient der weiteren Oxidation der Substratradikale bis zum Endprodukt (6) sowie der Regeneration des Farbstoffs, der durch Reoxidation in seine ursprüngliche Form zurückgeführt wird (7) (GOLLMICK and BERG, 1968; KNOWLES, 1971 a,b; KRAMER and MAUTE, 1972). Durch die Photooxidation entstehen für die Zelle häufig toxische Zwischenprodukte, wie es das folgende Reaktionsschema zeigt:

$$^3F + ZH_2 \longrightarrow FH_2 + Z \qquad (8)$$

$$FH_2 + O_2 \longrightarrow F + H_2O_2 \qquad (9)$$

Durch die Wasserstoffabstraktionsreaktion (8) kommt es in diesem speziellen Fall zur Wasserstoffperoxidbildung (9) (BERG and JACOB, 1962).

Bedingung für das Zustandekommen einer photochemischen Reaktion nach dem radikalischen Mechanismus ist ein unterschied-

liches Oxidationspotential von Substrat und Photosensibilisator, wobei der angeregte Farbstoff das für die Energieübertragung notwendige höhere Potential haben muß. Thiopyronin ist aufgrund seines für Farbstoffe recht hohen Oxidationspotentials von + 950 mV ein guter Sensibilisator. Sein bevorzugtes Substrat ist Guanin, das mit einem Oxidationspotential von + 850 mV das niedrigste Potential aller natürlichen Nukleinsäuren besitzt (KITTLER and LÜBER, 1974; LÜBER and KITTLER, 1976).

In den beschriebenen Beispielen eines radikalischen Mechanismus reagiert der angeregte Farbstoff zuerst mit dem biologischen Substrat. Ebenso häufig verlaufen photochemische Reaktionen nach dem Singlett-Oxigen Mechanismus. Molekularer Sauerstoff liegt im Grundzustand immer als Triplettmolekül ($^3O_2$) vor. Eine Energieübertragung vom angeregten Farbstoff im Zustand eines Triplettmoleküls zum Sauerstoff hat die Bildung von Singlett-Oxigen ($^1O_2$) zur Folge, welches hochreaktiv ist und als Zwischenprodukt an vielen biologisch chemischen Reaktionen teilnimmt (KEARNS, 1971).

II.

$$^3F + {}^3O_2 \longrightarrow F + {}^1O_2 \qquad (10)$$

$$^1O_2 + Z \longrightarrow ZO_2 \qquad (11)$$

$$^3F + {}^3O_2 \longrightarrow (F...O_2)^* \qquad (12)$$

$$(Z...O_2)^* + Z \longrightarrow F + ZO_2 \qquad (13)$$

Molekularer Sauerstoff wird bei Kontakt mit dem angeregten Farbstoff in die reaktive Singlett-Form überführt (10), die anschließend mit einem biologischen Substrat reagiert (FOOTE et al., 1965; GOLLNICK et al., 1970; JORI and GAUZZO, 1970), oder der angeregte Farbstoff bildet mit dem Sauerstoff einen sehr reaktiven, kurzlebigen Farbstoff-Sauerstoff-Komplex (12), der als Photoperoxid oder Moloxid bezeichnet wird und der als Oberträger des Sauerstoffs auf ungesättigte Zellmoleküle fungiert, wodurch diese oxidiert werden, während der Farbstoff in den Grundzustand zurückfällt (13) (GOLLNICK and

SCHENK, 1964; SCHENK and KOCH, 1960; SCHENK, 1970).

1.3. Zum Wirkmechanismus der farbstoffsensibilisierenden Inaktivierung mit TP

Umfangreiche in vitro-Versuche zu diesem Thema wurden auch mit Thiopyronin durchgeführt. Dabei wurde die Farbstoffwirkung auf DNS, RNS und zelleigene Enzymsysteme wohl am eingehendsten untersucht. Obwohl TP mit der DNS sowohl eine schwache Außenbindung (elektrostatische Anziehung) als auch eine starke Innenbindung (Interkalationsbindung) eingehen kann (MICHELER, 1972), genügt bereits eine schwache Bindung zur photodynamischen Sensibilisierung (PIETTE, 1978 a).

Die Wirkung des TP auf die DNS resultiert vor allem aus einer Zerstörung der Purinbase Guanin nach dem radikalischen Mechanismus. Adenin als zweite Purinbase wird nicht angegriffen (WACKER, 1963; LOCHMANN, 1964). Guanin wird vom angelagerten TP-Radikal oxidiert ($TP^+ + G \rightarrow G^+ + TP$), wodurch die N-glykosidische Bindung zwischen Zucker und Base gelöst wird, und die Base aus der Kette entfernt werden kann. Es entsteht dadurch eine alkali-labile Stelle im Strang, an der leicht ein Strangbruch induziert werden kann (TRIEBEL et al., 1978 a; BERG et al., 1978). Infolge des TP-induzierten Photooxidationsprozesses ändert sich die molekulare Grundstruktur und damit verbunden die allgemeine Stabilität der DNS. Es kommt zur lokalen Auflösung der Doppelhelix, wodurch sich Schmelzpunkt, Viskosität und Molekulargewicht der DNS ändern (TRIEBEL et al., 1978 b; BERG, 1978).

TP bindet jedoch nicht nur an Kern-DNS, sondern auch an alle anderen zellulären Nukleinsäuren, wie mitochondriale DNS (mtDNS),Boten-RNS (mRNS), ribosomale RNS (rRNS) und transfer RNS (tRNS) (MICHELER, 1972; SCHÖTZE, 1982).

Es erscheint als logische Folgerung, daß die Zerstörung des Guanins in DNS und RNS und die hieraus resultierenden Konfigurationsänderungen des Moleküls zu einem starken Verlust der biologischen Aktivität im komplexen System der Zelle führen kann.

Im zellfreien System wurde nachgewiesen, daß die Matrizen-Aktivität photodynamisch behandelter DNS für die RNS-Polymerase stark gehemmt ist (CHANDRA and WACKER, 1966), daß die Fähigkeit synthetischer RNS, den Aminosäureeinbau zu steuern, nach photodynamischer Behandlung mit steigendem Guaningehalt der Polymere sinkt (CHANDRA and WACKER, 1966), daß die Amino-Akzeptor-Aktivität photodynamisch behandelter tRNS um so stärker beeinträchtigt wird, je guaninhaltiger deren Codone sind (PIETTE and MOORE, 1982; HOUBA-HERIN et al., 1983).

TP reagiert nicht nur mit Nukleinsäuren, sondern ist in der Lage, in vitro an alle bisher untersuchten cytoplasmatischen Zellkomponente zu binden, wobei über den molekularen Mechanismus der dabei ablaufenden photochemischen Reaktion in vielen Fällen noch Unklarheit herrscht. Nicht immer bewirkt eine Farbstoff-Substrat-Bindung die photodynamische Zerstörung des Substrats. So gibt es Zellbestandteile, die mehr und andere, die weniger sensibel gegenüber photodynamischer Behandlung reagieren. Das ist wichtig zu wissen, um Aussagen über den Mechanismus der photodynamischen Schädigung einer Zelle machen zu können.

MICHELER (1972) konnte nachweisen, daß sich TP in vivo als erstes an Zellwand und Zellmembran anlagert. Mit steigender Farbstoffkonzentration im Zellinneren werden auch andere cytoplasmatische Bestandteile wie Ribosomen und Mitochondrien besetzt. Die Bindung an die löslichen Proteine des Cytoplasmas dagegen ist gering. Nur 1 % des Farbstoffs gelangt in den Kern, wovon der größte Teil (0,46 %) von der Kernmembran und der kleinere Teil (0,18 %) von nukleinsäurehaltigem Material gebunden wird (LOCHMANN et al., 1976).

1.4. Zur biologischen Wirkung des photodynamischen Effekts

Man erkennt bereits aus diesen Ausführungen, daß die Erforschung des photodynamischen Effekts von hoher Komplexität ist. Nur die Arbeit auf unterschiedlichen wissenschaftlichen Teilgebieten der Chemie, Physik und Biologie ermöglicht es, unser Wissen über den Wirkmechanismus der photodynamischen Inaktivierung mosaikartig zu vervollständigen.

Mit der biologischen Wirkung von TP beschäftigen sich vor allem Wissenschaftler der Fachrichtungen Strahlenbiologie und Mikrobiologie, insbesondere Genetiker, die die inaktivierende und mutagene Wirkung dieses Photosensibilisators auf Viren, Bakterien und Hefezellen untersuchen.

Dabei geht es vor allem um die Frage, an welchen Zellbestandteilen bevorzugt photodynamische Schäden auftreten und welcher dieser Schäden letztendlich zum Zelltod führt. Möglich wäre eine Schädigung der DNS, also ein genetischer Schaden, wie er auch nach UV- und Röntgenbestrahlung von Mikroorganismen auftritt und der in diesem speziellen Fall die relevante Ursache für das Absterben der Zelle ist. Aber auch die photodynamische Inaktivierung lebenswichtiger cytoplasmatischer Stoffwechselsysteme stand als Ursache der TP-sensibilisierten Zellschädigung zur Diskussion. Am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin wurden in den sechziger und siebziger Jahren photodynamische Untersuchungen mit verschiedenen Farbstoffen, insbesondere mit Thiopyronin, an der eukaryontischen Modellzelle Saccharomyces cerevivisiae durchgeführt. Diese Arbeiten führten zu Ergebnissen, die auf eine nicht genetische Schädigung der eukaryontischen Zelle schließen ließen, denn es konnten weder Mutationen nach photodynamischer Behandlung mit TP, noch eine Bindung dieses Farbstoffes an die DNS in vivo nachgewiesen werden (LOCHMANN et al., 1964; LOCHMANN et al., 1976). Auch die vom Ploidiegrad homozygoter und isogenetischer Hefestämme unabhängige Inaktivierungsrate läßt eine Schädigung des eukaryontischen Erbmaterials unwahrscheinlich erscheinen (LOCHMANN et al., 1964; LOCHMANN and STEIN,

1964; LOCHMANN et al., 1965). Dagegen stellte man eine Beeinträchtigung verschiedener Stoffwechselprozesse wie Atmung, Gärung, RNS- und Proteinsynthese nach photodynamischer Behandlung der Hefezellen fest (MICHELER, 1972; MICHELER et al., 1973; WATANABE, 1976).

Aufgrund dieser Ergebnisse begann man, die therapeutische Verwendbarkeit von Thiopyronin zu prüfen, um mit diesem Photosensibilisator einen gleichwertigen Ersatz für das in der Therapie der Psoriasis (Schuppenflechte) angewandte 8-Methoxipsoralen (8-MOP) zu schaffen - ein Psoralenderivat, dessen Unschädlichkeit für den menschlichen Organismus in zunehmendem Maße angezweifelt wird.

Die Symptome dieser Hautkrankheit, die durch eine stark erhöhte Mitoserate in den unteren Epidermisschichten entsteht (WEINSTEIN et al., 1971), schwinden nach photodynamischer Behandlung mit 8-MOP (PARRISH et al., 1974; WOLFF et al., 1976). Orale Gaben von 8-MOP und die anschließende Bestrahlung der erkrankten Körperteile mit langwelligem UV (UV-A, 315 nm - 400 nm) bewirken eine Zellteilungshemmung der stark proliferierenden Hautschichten. Obwohl sich diese sogenannte PUVA-Therapie inzwischen zu einer anerkannten angewandten Therapieform entwickelt hat, treten neben beachtlichen Behandlungserfolgen doch auch immer wieder unerwartete Komplikationen bei PUVA-behandelten Patienten auf (BURNETT, 1982), die eine Risikoabschätzung dieser Photochemotherapie erschweren. Blutuntersuchungen an Psoriasis-Patienten, die sich einer Langzeit-PUVA-Therapie unterziehen mußten, zeigten, daß durch die Behandlung Modifikationen an den Lymphocytenoberflächen auftraten sowie eine Änderung in ihrer Gesamtverteilung (MORISON et al., 1983). Gleichzeitig trat bei allen untersuchten Patienten eine vorzeitige Alterung der Haut in Erscheinung. Durch die kombinierte 8-MOP-UV-A-Behandlung werden in der Epidermis von Mensch und nackter Maus Sonnenbrandzellen, sogenannte SBCs, induziert (HASHIMOTO et al., 1978; YOUNG and MAGNUS, 1981; LEY et al., 1977; YOUNG and MAGNUS,

1982), die identisch sind mit den nach kurzwelliger UV (UV-C, 254 nm und UV-B, 280 nm - 315 nm)-Bestrahlung auftretenden charakteristischen Sonnenbrandzellen (WOLFF et al., 1976). Diese SBCs sind aller Wahrscheinlichkeit nach eine Folge der DNA-Interstrand-Crosslinks (YOUNG and MAGNUS, 1982), die wiederum eine typische Läsion an photodynamisch behandelter DNA mit einem bifunktionalen Photosensibilisator wie 8-MOP darstellen (DALL'ACQUA et al., 1972, 1979; SCOTT et al., 1976; SONG and TAPLEY jr., 1979) und auch bei in vivo-Systemen nachgewiesen werden konnten (DALL'ACQUA et al., 1972; CECH et al., 1979).

Da der relevante Schaden für die Zellinaktivierung an der DNA gesetzt wird, stellt sich vor allem die Frage nach der carcinogegen Wirkung der PUVA-Langzeit-Behandlung. Gerade dies scheint für die Behandelten von besonderer Bedeutung, denn schon nach wenigen Jahren der routinemäßigen klinischen Anwendung traten erste Fälle von bösartigen Hauttumoren bei PUVA-behandelten Psoriasis-Patienten auf (STERN et al., 1979; GRUPPER and BERRETTI, 1980; HALPRIN, 1980; FARBER, 1980; STERN et al., 1982).

Das durch die angewandte 8-MOP-Photochemotherapie bestehende erhöhte Krebsrisiko für diesen Personenkreis sollte nicht ignoriert werden, sondern die Suche und Erprobung eines gleichwertigen, aber ungefährlichen, d.h. nicht mutagen und carcinogen wirkenden Photosensibilisators forcieren. Getestet wurden vor allem die als weniger schädlich anerkannten monofunktionalen photodynamisch wirksamen Furocoumarine wie Angelicin oder 3-Carbethoxypsoralen, die keine DNA-Interstrand-Crosslinks induzieren (AVERBECK et al., 1975; DALL'ACQUA et al., 1977; AVERBECK et al., 1979; YOUNG and MAGNUS, 1982), aber auch der Thioxanthenfarbstoff Thiopyronin stand zur Diskussion.

Um jedoch die Frage nach genetischen Schäden, hervorgerufen durch den PDE mit Thiopyronin, eindeutig klären zu können, müßte vor allem die mutationsauslösende Wirkung dieses Photosensibilisators eingehend geprüft werden. Versuche an Prokaryonten haben diesbezüglich zu positiven, d.h. die Mutagenität von TP bestätigenden Ergebnissen geführt (BÖHME and WACKER, 1963; NAKAI and SAEKI, 1964; RITCHI, 1965). Dagegen sind die Versuchsergebnisse von Mutationsversuchen an Hefen widersprüchlich. Einige Wissenschaftler, die sich mit diesem Problem beschäftigten, gelangten aufgrund ihrer Forschungsarbeiten zu dem Ergebnis der Nicht-Mutagenität von Thiopyronin auf eukaryontische Systeme(LOCHMANN et al., 1964; MARQUARDT and LAER, 1966). Untersuchungen an anderen Hefestämmen deuten jedoch darauf hin, daß die photodynamische Wirkung von TP möglicherweise doch genetische Schäden hervorrufen könnte, nachdem bei einem Stamm eine eindeutig erhöhte Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung mit TP gemessen und bei einem anderen Stamm wahrscheinlich gemacht wurde (KENTER and LASKOWSKI, 1978).

Gleichzeitig wurden von ROTH und seinen Mitarbeitern mehrere "photodynamisch sensible" Mutanten isoliert. Diese PDE-Sensibilität könnte auf einer Mutation beruhen, deren Folge der Ausfall bestimmter Reparaturenzyme ist (ROTH et al., 1978). Um zu diesem Problem allgemeingültige Aussagen machen zu können, müßten noch andere Hefestämme auf ihre Sensibilität und Mutagenität gegenüber dem Photosensibilisator Thiopyronin geprüft werden.

1.5. Problemstellung

Bei der Auswahl der Saccharomyces-Stämme zur hier vorliegenden Arbeit fiel auf, daß sich die im Genotyp unterschiedlichen Stämme in ihrer Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung deutlich unterschieden. Auffallend war dieser Unterschied zwischen den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM, die

unterschiedliche Bedürftigkeiten besitzen. 235-11 c mit dem Genotyp ade 2, lys 2, his 3, ura 1 erwies sich als ungewöhnlich resistent gegenüber photodynamischer Behandlung, während der Stamm 211-1 aM, eine Isoleucin-Valin-bedürftige Mutante, auf die gleiche Behandlung stark sensibel reagierte.

Gleichzeitig führte die Kultivierung des Stammes 235-11 c auf Glycerin-Medium zwecks Niedrighaltung der Atmungsdefekte zum sogenannten "Glycerin-Effekt", d.h. der normalerweise resistente Stamm wurde nach Anzucht auf Glycerin-Medium hochsensibel gegenüber photodynamischer Behandlung.

Zu ähnlichen Ergebnissen war man am hiesigen Institut bei strahlenbiologischen Untersuchungen an homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrads gelangt. Damals erkannte man, daß sich Isoleucin-Valin-bedürftige Mutanten durch einen Resistenzgewinn gegenüber Röntgenbestrahlung auszeichnen (SCHÄDEL and LASKOWSKI, 1967). Dieser an die Aminosäurebedürftigkeit gekoppelte Resistenz-Effekt trat lediglich bei Diplonten und Polyplonten auf und ließ sich zusätzlich durch verschiedene Vor- und Nachkulturbedingungen variieren. Dieser Einfluß konnte bis zur Umkehr der Empfindlichkeitsverhältnisse gesteigert werden.

Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang zwei Modelle, die eine Korrelation zwischen der Isoleucin-Valin-Mutation, den umweltbedingten Variationen des Strahlenresistenzgewinns und bestimmten Reparaturprozessen herzustellen versuchten (SCHÄDEL and LASKOWSKI, 1967; LASKOWSKI and SCHÄDEL, 1968). Die zu Beginn der experimentellen Arbeit mehr zufällig gefundenen Verhaltensweisen der Stämme gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP und die Ergebnisse aus den zuvor genannten strahlenbiologischen Forschungsarbeiten wurden richtungsweisend für den weiteren Verlauf der Versuche zur vorliegenden Arbeit.

So lag es nahe, das Problem der photodynamischen Sensibilität und Mutagenität von Saccharomyces cerevisiae gegenüber dem Photosensibilisator Thiopyronin noch einmal unter dem Aspekt der umweltabhängigen und der genotypischen Beeinflussung zu betrachten. Der Grundgedanke dabei war, die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt allgemein gehaltenen Aussagen über die TP-abhängige photodynamische Inaktivierung und Mutationsauslösung bei eukaryontischen Systemen weiter zu differenzieren, denn bisher wurden Sensibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Stämmen gegenüber gleichwertiger photodynamischer Behandlung nicht diskutiert. Aber gerade das scheint von Bedeutung, denn in der strahlenbiologischen Forschung geben stammspezifische Sensibilitätsunterschiede z.B. gegenüber UV- und Röntgenbestrahlung Hinweise auf die Wirkungsweise bestimmter Reparatursysteme. Die in diesem Zusammenhang isolierten UV- und Röntgenstrahlen-sensiblen Mutanten weisen meist ein vom Wildtyp abweichendes Mutationsverhalten auf. Es wäre demnach sinnvoll zu fragen, ob auch bei der photodynamischen Inaktivierung ähnliche Zusammenhänge bestehen.

Die Fragestellung lautet konkret:

Welche Faktoren beeinflussen die photodynamische Sensibilisierung mit TP bei verschiedenen Saccharomyces-Stämmen, d.h. kann die Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung unter bestimmten Voraussetzungen erhöht oder verringert werden?

- Gibt es umweltabhängige Sensibilitätsunterschiede bei einem Stamm?

- Welchen Einfluß haben cytoplasmatische Faktoren auf die photodynamische Inaktivierung bei gleichen Stämmen?

- Gibt es auffällige genotypische Sensibilitätsunterschiede, d.h. gibt es Stämme, die unter Standardbe-

dingungen gegenüber gleichwertiger photodynamischer Behandlung eine erhöhte Sensibilität oder eine besondere Resistenz aufweisen?

- Wie verhalten sich in diesem Punkt photodynamisch behandelte Stämme, die strahlensensibel gegenüber UV- und/oder Röntgenstrahlen sind im Vergleich zu Wildtypstämmen?

- Führt die photodynamische Behandlung mit Thiopyronin bei Saccharomyces cerevisiae zu einer erhöhten Mutationsrate, und in welchem Maße ist diese beeinflußbar von umweltabhängigen und cytoplasmatischen Faktoren?

- Welche Aussagen können aufgrund der Versuchsergebnisse über den molekularen Wirkort des photodynamischen Effekts bei Eukaryontenzellen gemacht werden?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Saccharomyces-Stämme

2.1.1. Beschreibung der Stämme

Die Untersuchungen wurden an nachfolgend aufgeführten haploiden und genetisch markierten Saccharomyces-Stämmen aus unserer Stammsammlung durchgeführt, die alle aus Isolierungs- und Kreuzungsexperimenten hervorgegangen sind (LASKOWSKI, 1962; LASKOWSKI et al., 1968; AVERBECK, 1970; KOWALSKI, 1971).

Stamm	PT	Strahlen-sensibilität	Bedürftigkeit	Reparatur-defekt
235-11 c	a	RAD	ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1	WT
2105-15	α	rad 2-20	ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1	exc^-
2121-140	α	rad 9- 4	ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1	rec^-
211-1 aM	α	RAD	ilv 2	WT

Die Stämme 235-11 c, 2105-15 und 2121-140 sind bis auf Paarungstyp (PT) und Strahlensensibilität isogen. Die Adenin- sowie die Lysinbedürftigkeit beruhen in beiden Fällen auf einer Mutation, die zur Entstehung von nonsense-Codonen des gleichen Typs geführt hat. Bei den Loci ade 2-1 und lys 2-1 handelt es sich um sogenannte ochre-Allele. Sie zeichnen sich aus durch Supersupprimierbarkeit, was bedeutet, daß bestimmte, ebenfalls mutierte, tRNA's in der Lage sind, mit diesen nonsense-Codonen zu paaren und es darum nicht zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese kommt. Ade 2-Mutanten zeichnen sich durch rote Koloniefärbung aus.

Stamm 2105-15 ist Excisions-Reparatur-Defekt (exc^-). Die Mutation rad 2-20 blockiert das Herausschneiden von UV-indu-

zierten Pyrimidin-Dimeren (RESNICK and SETLOW, 1972).

Stamm 2121-140 ist aufgrund der Strahlensensibilität verursachenden Mutation rad 9-4 wahrscheinlich defekt in der Rekombinations-Reparatur (rec^-).

Stamm 211-1 aM unterscheidet sich von den zuvor beschriebenen weitgehend isogenen Stämmen durch eine andere Stammbaumzugehörigkeit und ist demzufolge mit diesen genetisch nicht identisch. Gegenüber UV- und Röntgenbestrahlung zeigt er Wildtypverhalten. Die Isoleucin-Valin-Bedürftigkeit wird verursacht durch eine Mutation im Gen ILV 2, von der man annimmt, daß sie durch eine Basenpaar-Substitution entsteht (HAWTHORNE and FRIIS, 1964).

2.1.2. Aufbewahrung und Reinhaltung der Stämme

Alle Stammkulturen wurden auf kleinem Vollmedium Schrägagarröhrchen bei 4^o C aufbewahrt und zwecks Reinhaltung alle 4 - 6 Monate umgeimpft. Dazu wurde zur Überprüfung ihrer genetischen Eigenschaften ein Verdünnungsausstrich auf VM-Platten gemacht und nach 3 Tagen Bebrütung bei 30^o C einige der aufgewachsenen Kolonien mit einwandfreiem Zellbild abgeimpft. Diese wurden anschließend auf ihre genetische Reinheit hin folgendermaßen getestet:

a) Durch Kreuzung mit je einem a und einem α Teststamm konnte der Paarungstyp bestätigt werden, da nur Zellen mit entgegengesetztem Paarungstyp Zygoten bilden;

b) ein Stempeln der Kolonien auf Glycerin- und Mangelmedium-Platten gab Auskunft über Atmungskompetenz und Bedürftigkeit der Zellen (LEDERBERG and LEDERBERG, 1952);

c) zur Bestimmung der Strahlensensibilität wurden von allen isolierten Kolonien UV-Dosis-Effekt-Kurven angefertigt und anschließend mit Standard-Kurven-Werten verglichen.

Die Kolonien, die alle Testbedingungen optimal erfüllten, wurden überimpft auf kleine Schrägagarröhrchen und dienten für die nächsten 4-6 Monate als Stammkultur.

2.2. Substanzen

2.2.1. Medien und Puffer

Es wurden folgende Medien verwendet:

a) Schrägagar
   2 % Agar (Difco)
   2 % Glucose
   1 % Yeast-Extract (Difco)
   0,5 % Pepton

b) Festes Nährmedium für Vollmedium-Platten (VM)
   2 % Agar (Merck)
   2 % Glucose
   1 % Yeast-Extract
   0,5 % Pepton

c) Festes Nährmedium mit verschiedenen Kohlehydraten
   Für die Anzucht der Stämme auf Vollmedium mit verschiedenen Kohlehydratquellen wurde wiederum das unter b) beschriebene Medium hergestellt, das jedoch anstelle der Glucose den entsprechenden Zucker in gleicher Konzentration enthielt:
   2 % Agar
   2 % Saccharose/Lactose/Maltose
   1 % Yeast-Extract
   0,5 % Pepton

d) Festes Nährmedium mit unterschiedlicher Glucose-Konzentration
Zur Anzucht der Stämme auf unterschiedlich konzentrierten Glucose-Vollmedium-Platten wurde das unter b) beschriebene Nährmedium mit entsprechend abgeänderter Glucose-Konzentration verwendet:

2 % Agar
0,5 %/ 1 % / 2 % / 4 % Glucose
1 % Yeast-Extract
0,5 % Pepton

e) Flüssiges Nährmedium
wie a), jedoch ohne Zugabe von Agar

f) Glycerin-Medium (GM)
wie b), jedoch 2 % Glycerin anstelle der Glucose

g) Synthetisches Medium (SM) für die Stämme 235-11 c, 2105-15, 2121-140

2 % Agar
2 % Glucose
0,67 % Yeast Nitrogen Base (Difco)
20 mg/l Adenin
10 mg/l Uracil
10 mg/l Histidin
50 mg/l Lysin

h) Synthetisches Medium für den Stamm 211-1 aM

2 % Agar
2 % Glucose
2 % Yeast Nitrogen Base
100 mg/l Isoleucin
100 mg/l Valin

i) Mangelmedium (MM)
wie g), respektive h), jedoch unter Weglassung einer Aminosäure bzw. Nucleotidbase; z.B. MM-Ade entspricht dem unter g) beschriebenen synthetischen Medium ohne Adenin.

k) Präsporulationsmedium

2 % Agar
2 % Glucose
0,2 % Ammoniumsulfat
0,2 % Kaliumhydrogensulfat
0,5 % Yeast-Extract (Difco)
Das Medium sollte "alt" sein, d.h. mindestens 7 Tage vor Gebrauch gekocht werden.

l) Sporulationsmedium

2 % Agar
0,82 % Kalium-Acetat
0,1 % Glucose
0,25 % Yeast-Extract (Difco)
0,1864 % Kaliumchlorid
0,035 % Magnesiumsulfat
Puffer
0,05 m KH_2PO_4-Lösung, pH 4,8
Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH eingestellt.

Medien und Puffer wurden mit ionenausgetauschtem Wasser zubereitet und im Autoklaven sterilisiert: synthetische und Mangelmedien 25 min bei 115° C, alle anderen Medien und Puffer 30 min bei 123°C.

2.2.2. Thiopyronin (TP)

Der Thioxanthenfarbstoff Thiopyronin wurde in kristalliner Form von der Firma MERCK als $ZnCl_2$-Doppelsalz geliefert. TP hat ein Molekulargewicht von 455. Gelöst in wässriger neutraler Lösung liegt es als Kation vor und bildet bei steigender Eigenkonzentration TP-Dimere und TP-Aggregate (MICHELER, 1972). Thiopyronin besitzt im sichtbaren Bereich des Spektrums ein Absorptionsmaximum bei 564 nm und im kurzwelligen Bereich bei 280 nm (siehe Abbildung 1). Für alle Versuche zum photodynamischen Effekt wurde eine mit H_2O hergestellte TP-Stammlösung

verwendet, deren Konzentration 200 µg/ml betrug. Radioaktiv markierte TP-H^3-Lösung mit der TP-H^3-Stammlösung wurde mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe LOCHMANN zur Verfügung gestellt. Die Radioaktivität dieser Lösung betrug 37 mCi/ml.

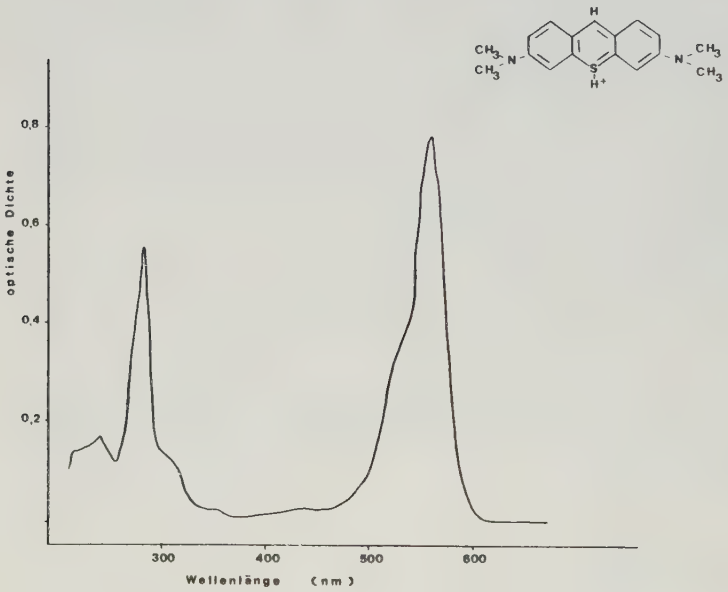


Abb. 1.: Absorptionsspektrum und Strukturformel von TP in neutraler Lösung.

2.3. Bestrahlungsquellen

Für alle photodynamischen Inaktivierungs- und Mutationsversuche wurde eine OSRAM Glühbirne, 500 Watt, verwendet, die sich in einem Abstand von 30 cm zu der zu bestrahlenden Zellsuspensionsoberfläche befand. Eine wiederholt durchgeführte Messung im Abstand von 3 Monaten mit dem 80 x Optometer TM (United Dedector Technology, Inc.) ergab eine Beleuchtungsstärke von durchschnittlich $1{,}16 \times 10^2$ Lux. Das entspricht einer Strahlungsleistung von $16{,}7 \times 10^3$ μW.

Um konstante Bestrahlungsbedingungen zu schaffen, mußte wegen der langen Bestrahlungszeiten (bis zu 60 min) und der damit verbundenen starken Wärmeentwicklung durch die Glühbirne die zu bestrahlende Zellsuspension ständig gekühlt werden, um sie auf Zimmertemperatur zu halten. Das geschah mit einem Durchlauf-Kühlsystem, an das ein doppelwandiges Glasschälchen angeschlossen war, das die Zellsuspension enthielt und von Kühlwasser durchflossen wurde. Durch ständiges Rühren wurde eine gleichmäßige Bestrahlung aller in der Suspension enthaltenen Zellen gewährleistet.

2.4. Anzucht der Kulturen

Zur Anzucht der Versuchskultur wurde je eine Platinöse der Stammkultur in ca. 1 ml - 5 ml Puffer suspendiert und anschließend auf die Vorkultur bestimmenden Medien-Platten verteilt. Das waren entsprechend der gewählten Versuchsbedingungen VM-Platten, GM-Platten, VM-Platten mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen oder Kohlehydratquellen. Anschließend wurden die Platten 3 Tage bei 30° C und guter Belüftung bebrütet. Für die Anzucht der Kultur unter Ausschluß von Sauerstoff (Anaerob-Kultur) diente eine Oxoid-Anaerob-Box.

In dieser wurden die beimpften VM-Platten 5 - 7 Tage bei 30° C bebrütet, da bei dieser Anzuchtmethode infolge Gärung die Wachstumsgeschwindigkeit langsamer verläuft.

2.5. Versuchsdurchführung

2.5.1. Suspensionsgewinnung

Am Versuchstag wurde der Zellrasen der Vorkultur, bestehend aus einer Population stationärer Zellen, mit Puffer (KH_2PO_4) abgewaschen und je nach Zellausbeute in einem bis mehreren Zentrifugenröhrchen gesammelt, 3 min bei 3 000 U/min abzentrifugiert und das Pellet nach Abgießen des Überstands wieder in 8 ml frischen Puffer aufgewirbelt. Dieser als Waschen bezeichnete Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und diente der Beseitigung von anhaftenden Medienresten. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Zentrifugation bei 1 200 U/min zur Anreicherung von Einzelzellen. Die Zentrifugationszeit war abhängig vom jeweiligen Stamm und lag zwischen 2 min 30 sec und 6 min. Danach konnte das obere Drittel der Zellsuspension, das vorwiegend aus Einzelzellen bestand, abgesaugt und gesammelt werden. Die Titerbestimmung erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer. Anschließend wurde der für die Versuche erforderliche Zelltiter eingestellt. Der Knospenanteil variierte aufgrund der unterschiedlichen Vorkulturbedingungen und lag zwischen 1 % bis 10 %.

2.5.2. Inkubationsbedingungen

In entsprechenden Vorversuchen wurden die für die Versuchsdurchführung optimalsten Rahmenbedingungen wie Zelltiter, TP-Konzentration, TP-Einwirkzeit und Bestrahlungszeit nach folgenden Kriterien ermittelt:

Die gewählte TP-Konzentration sollte innerhalb der Einwirkzeit nicht toxisch wirken, aber ausreichen, um von allen Zellen der Suspension gleichmäßig bis zum Sättigungsgrad aufgenommen zu werden. Der Zelltiter sollte so eingestellt

werden, daß a) die vorgenannten Bedingungen erfüllt, b) nach photodynamischer Behandlung der Suspension keine 100 %ige Abtötung der Zellen eintritt und c) keine Abschattungseffekte während der Bestrahlung auftreten. Aufgrund dieser Kriterien erwies sich für alle Inaktivierungsversuche

ein Zelltiter von 1 x 10^6/0,1 ml,
eine TP-Konzentration von 10 µg/ml,
eine TP-Einwirkzeit von 30 min
und
eine additive Bestrahlungszeit von 0 - 60 min

als optimal.

Da bei der photodynamischen Inaktivierung eine Vielzahl an Faktoren einen Einfluß auf die Überlebensrate haben - wie die nachfolgend beschriebenen Versuchsergebnisse noch zeigen - wurde auf konstante Einhaltung dieser vier Faktoren geachtet. Bei allen Mutationsversuchen mußte der Zelltiter auf 1 x 10^7/0,1 ml erhöht werden, um noch eine ausreichende Zahl an auswertbaren Mutanten zu erhalten. Bei dieser Zellkonzentration treten aber bereits Abschattungseffekte auf, die bei gleicher Dosisleistung zu höheren Überlebensraten führen. TP-Konzentration und Inkubationszeit waren die gleichen wie bei den Inaktivierungsversuchen.

2.5.3. Inaktivierungsversuche

Nach Anzucht des Stammes und Aufbereitung der Zellsuspension wurde der Zelltiter so eingestellt, daß nach Zugabe der TP-Stammlösung (200 µg/ml) die Suspension die gewünschte Zellzahl von 1 x 10^7/ml und die erforderliche TP-Konzentration von 10 µg/ml enthielt. Die Zugabe von TP zur Zellsuspension erfolgte im Dunkeln, um nicht schon während der Inkubationszeit eine photodynamische Schädigung entstehen zu lassen. Nach 30 min Dunkelwirkung (DW) wurden 4 ml der

TP-behandelten Zellsuspension unverdünnt in das doppelwandige Bestrahlungsschälchen gegeben und additiv bis maximal 60 min bei laufender Kühlung und unter ständigem Rühren bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden in zeitlichen Abständen von 5 min - 10 min 0,1 ml Proben entnommen, entsprechend verdünnt und je 0,1 ml auf Vollmedium-Platten verspatelt. Als Kontrolle diente eine unbestrahlte TP-behandelte Probe.

Nach dreitätiger Bebrütung bei 30°C konnten die Überlebenden der photodynamischen Behandlung durch Zählen der aufgewachsenen Makrokolonien ermittelt werden.

2.5.4. Wachstumskurven

Nach Anzucht der Stämme auf VM- oder GM-Platten wurde die Zellsuspension,wie unter 2.5.1. beschrieben, aufbereitet und die zuletzt erhaltene Zellsuspension nochmals abzentrifugiert. Das vorwiegend aus Einzelzellen bestehende Pellet wurde in entsprechender Menge flüssigem Vollmedium aufgenommen. Je 10 ml dieser Inkubationslösung wurden in Nasen-Erlenmeyerkolben im Wasserbad bei 30° C bis zu 6 Stunden geschüttelt. Sofort nach der Inkubation und anschließend alle 30 min wurde die optische Zelldichte mit einem Lange-Kolorimeter bestimmt.

2.5.5. TP-Aufnahme-Versuche

Die TP-Aufnahme in die Zellen wurde durch eine TP-Aufnahme-Kinetik mit radioaktiv markiertem TP-H^3 bestimmt.

Es wurden die Stämme nach Anzucht auf VM oder GM aufbereitet und mit 10 µg TP/ml inkubiert - wie zuvor beschrieben. Die radioaktive TP-H^3-Stammlösung (37 mCi/ml) wurde als erstes mit Aqua dest. und der normalen TP-Stammlösung (200 µg/ml) vorverdünnt. Nach Zugabe dieses TP-H^3/TP-Gemisches zur Zell-

suspension entstand eine Inkubationslösung, die eine TP-Konzentration von 10 µg/TP-H^3/TP/ml, eine Aktivität von 5,25 µCi und einen Titer von 1 x 10^6 Zellen/0,1 ml aufwies.

Die Zellsuspension wurde während der TP-Inkubationszeit ständig gerührt. In bestimmten Abständen wurden 1 ml Proben entnommen und sofort gewaschen, um das in Lösung befindliche und den Zellen anhaftende restliche TP zu entfernen. Dazu wurde die 1 ml-Probe in 6 ml Aqua dest. aufgenommen, aufgewirbelt und 3 min bei 3 500 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml H_2O und 1,8 ml Szintillationsflüssigkeit resuspendiert und die Radioaktivität in einem PACKARD-Szintillationszähler bestimmt.

2.5.6. Induktion von Atmungsdefizienten

Die Induktion von Atmungsdefekten erfordert normalerweise keine zusätzlichen Versuche, da sie zusammen mit den Inaktivierungsversuchen durchgeführt werden können, indem man die bestrahlten Proben gleichzeitig auch auf GM-Platten, worauf nur atmungskompetente Zellen wachsen, ausplattiert. Durch Auszählen der auf VM und GM aufgewachsenen Makrokolonien erhält man den für eine bestimmte Dosis charakteristischen Anteil an Atmungsdefekten, indem man die auf GM ermittelte Zahl aufgewachsener atmungskompetenter Kolonien von der auf VM ermittelten Gesamtkoloniezahl abzieht.

Nachdem jedoch einige Experimente dieser Art gezeigt hatten, daß für die korrekte Bestimmung der Induktion atmungsdefekter Mutanten die vorgegebene TP-Konzentration von 10 µg/ml zu hoch angesetzt war bzw. die für die Inaktivierungsversuche gewählten Bestrahlungszeiten zu lang waren, mußten die Induktionsversuche mit abgeändertem Parameter gesondert durchgeführt werden.

Da es methodisch schwierig gewesen wäre, mit der Bestrahlungsanlage exakte Bestrahlungszeiten im Sekundenbereich zu erzielen, wurde diesbezüglich auf eine Änderung verzichtet. Dagegen wurde die TP-Konzentration um den Faktor 10 verringert.

Nach Anzucht der Stämme unter den jeweils gewählten Vorkulturbedingungen wurde die vorbereitete Zellsuspension mit 1 µg TP/ml 30 min dunkel inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung entsprach den Inaktivierungsexperimenten. Die bestrahlten und verdünnten Proben wurden auf VM- und GM-Platten parallel ausplattiert. Nach 3 Tagen Bebrütung bei 30° C konnte der Anteil an Atmungsdefekten bestimmt werden.

2.5.7. Mutationsversuche

Das Problem der mutationsauslösenden Wirkung des hier untersuchten Fotosensibilisators Thiopyronin konnte methodisch mit Hilfe des Rückmutationstests gelöst werden. Bei diesem relativ einfach durchzuführenden Test wird nach photodynamischer Behandlung des Aminosäure- bzw. Basen-bedürftigen Stammes die Mutationsrate von der Auxotrophie zur Prototrophie bestimmt. Plattiert man die aus Auxotrophen und Mutanten bestehende Zellsuspension auf das entsprechende Mangelmedium, so wachsen nur die Zellen zu Makrokolonien heran, die die entsprechende Synthesefähigkeit durch Mutation zurückgewonnen haben. Das sind alle echten Revertanten nach Rückmutation des ursprünglich mutierten Codons im Strukturgenbereich und alle Supressormutanten nach Mutation in einem transfer-RNS-Gen.

Bei den hier getesteten Stämmen mit den genetischen Markern ade 2-1 und lys 2-1 wurde ein Adenin-freies und ein Lysin-freies Medium verwendet. Zur Unterscheidung von Locus- und Supressormutanten kann der Stamm zusätzlich auf

ein Mangelmedium ausplattiert werden, das weder Adenin noch Lysin enthält. Echte Revertanten, die den Genotyp ADE/lys oder ade/LYS aufweisen, können hierauf nicht wachsen. Da die Wahrscheinlichkeit einer Rückmutation in beiden Loci außerordentlich gering ist, wird es sich bei den hier aufgewachsenen Mutanten größtenteils um Supressormutanten handeln, die den Phänotyp ADE/LYS aufweisen. Eine Mutation im Genbereich, der das Anticodon einer tRNS codiert, ermöglicht die Ablesung von nonsense Codonen gleichen Typs, wie sie bei der Mutation ade 2-1 und lys 2-1 vorliegen.

Zur Bestimmung der Rückmutationsrate wurden 4 ml der vorbereiteten Zellsuspension 30 min in TP der Konzentration 10 µg/ml dunkel inkubiert und anschließend im doppelwandigen Bestrahlungsschälchen bei laufender Kühlung und unter ständigem Rühren bis zu 40 min mit sichtbarem Licht bestrahlt. Eine additive Bestrahlung kam bei diesen Versuchen wegen der großen Probenentnahme - bis zu 2 ml pro Versuchspunkt - nicht infrage. Damit das Aufwachsen einer für die spätere Auswertung genügend hohen Anzahl überlebender Mutanten garantiert war, mußte die zu bestrahlende Zellsuspension mindestens einen Titer von 1×10^7 Zellen/0,1 ml aufweisen. In bestimmten zeitlichen Abständen wurden Proben entnommen und unverdünnt zu je 0,1 ml auf Adenin-freies, Lysin-freies, Adenin- und Lysin-freies Mangelmedium (MM) ausplattiert und gleichzeitig eine entsprechend verdünnte Probe auf synthetischem Medium (SM).

Nach 10 - 14-tägiger Bebrütung bei 30° C konnten die Überlebenden auf SM und die auf MM aufgewachsenen Mutanten gezählt und die Mutationsrate bestimmt werden.

Durch den hohen Bestrahlungstiter von 1×10^7 Zellen/0,1 ml trat bei den Mutationsversuchen das Problem der Abschattung auf. Das bedeutet, daß bei Bestrahlung dichter Zellsuspensionen die einzelnen Zellen durch gegenseitige Abschattung von insgesamt weniger Lichtquanten getroffen werden. Dadurch

ergeben sich Unterschiede in der Überlebensrate gleichartig behandelter und gleichlang bestrahlter, aber unterschiedlich konzentrierter Suspensionen, wobei die höher konzentrierte Zellsuspension einen höheren Anteil an Überlebenden aufweist. Aus diesem Grund wurde bei allen Mutationsversuchen gleichzeitig eine verdünnte Suspension mit dem Titer 1 x 10^6 Zellen/ 0,1 ml bestrahlt. Auf diese Weise läßt sich nicht nur die Inaktivierungsrate in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit auf die dichte Zellsuspension errechnen, sondern auch die wirksame Dosis (Bestrahlungszeit) bestimmen. Ohne diese Korrektur wäre ein direkter Vergleich zwischen Strahlendosis (entspricht der Bestrahlungszeit), Inaktivierungsrate und Mutationsrate nicht möglich.

2.6. Genetische Analysen

2.6.1. Kreuzung von Haplonten

Die Kreuzung zweier Haplonten geschieht in der logarithmischen Wachstumsphase. Dazu wurde je eine Impföse der zu kreuzenden Stämme auf eine Vollmedium-Platte ausgestrichen und über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Morgen wurden die beiden Stämme durch Überimpfen oder Überstempeln zusammengebracht. Nach 3 - 5 Stunden Bebrütung waren die ersten Zygoten mikroskopisch sichtbar. Die anschließende Kühlstellung der Kultur bei 4^o C begünstigte die weitere Ausbildung von Zygoten und verhinderte gleichzeitig eine Teilung der ersten Diplonten. Nach 24 Stunden wurde ein Verdünnungsausstrich der gemischten Kulturen hergestellt und wiederum 2 Tage bebrütet. Danach ließen sich die aufgewachsenen Diplonten anhand ihrer Kolonieform und -größe von den noch vorhandenen Haplonten unterscheiden. Einige Diplonten-Kolonien mit gutem Zellbild wurden abgeimpft und auf ihre Reinheit überprüft, um das Auftreten von Haplonten/Diplonten Mischkolonien auszuschließen. Dazu wurde der neue αa-Diplont mit je einem a- und einem α-Haplonten gekreuzt und auf Zygotenbildung

hin geprüft, die im vorliegenden Fall nicht auftrat, was die Echtheit des isolierten Diplonten bestätigte. Auch ein Test auf noch vorhandene Bedürftigkeiten durch Ausplattieren des Diplonten auf Mangelmedium fiel negativ aus. Der Diplont zeigte phänotypisch Wildtypverhalten, da sich bei Kreuzung zweier Haplonten mit unterschiedlichen Bedürftigkeiten diese beim neu entstandenen diploiden Stamm kompensieren.

Eine Kolonie des Diplonten wurde auf kleine Schrägagarröhrchen überimpft und diente für alle weiteren Versuche als Stammkultur.

2.6.2. Massensporulation

Die Übertragung eines diploiden Stammes von einem üppigen Nährboden auf ein Hungermedium induziert bei diesem die Sporenbildung, Voraussetzung für alle weiteren genetischen Analysen. Sind genügend Asci mit 4 Sporen vorhanden, so lohnt sich eine Tetradenanalyse, wobei die 4 Meioseprodukte eines Ascus mit Hilfe des Mikromanipulators isoliert und anschließend zu Kolonien herangezüchtet werden können. Die genetische Analyse der einzelnen Kolonien gibt direkten Aufschluß über die erfolgte Verteilung der Merkmale.

Bei der hier durchgeführten Kreuzung zeigte der Diplont jedoch nur eine geringe Tendenz zur Sporenbildung; zudem enthielten die wenigen mikroskopisch auffindbaren Ascen nur selten 4 Sporen. Eine Isolierung der Sporen mit Hilfe des Mikromanipulators erwies sich aus diesen Gründen als langwierig,und die Keimfähigkeit der letztendlich isolierten Meioseprodukte war gering.

Darum wurde auf die Technik der Massensporulation (EMEIS and GUTZ, 1955) zurückgegriffen.

Der diploide Stamm wurde ca. 16 Stunden auf einem mindestens 7 Tage alten Präsporulationsmedium (üppiges Nährmedium) bei Zimmertemperatur angezüchtet. Am nächsten Morgen wurde der Stamm mit Puffer abgespült, zweimal gewaschen und anschließend mit 10 ml Sporulationsmedium (Hungermedium) auf einen Titer von 1 x 10^6 Zellen/0,1 ml gebracht. Dieser Sporulationsansatz wurde in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben im Wasserbad bei 30^o C und guter Belüftung 4 - 7 Tage geschüttelt. Die Sporenbildung wurde unter dem Mikroskop anhand zwischenzeitlich entnommener Proben beobachtet. Nach Sichtbarwerden der Ascen wurde der Sporulationsansatz zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer plus 0,3 ml Schneckenenzym aufgenommen. Nach einer Einwirkzeit von 90 min konnte die Suspension mit 5 ml Puffer versetzt und abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde in 4 ml Tween-Lösung (TWEEN 80, 1 : 200 in Puffer verdünnt) aufgenommen, kräftig geschüttelt und nochmals abzentrifugiert. Im Anschluß daran wurde das Pellet mit 4 ml Tween-Lösung versetzt, aufgewirbelt und zur Abtötung möglichst vieler vegetativer Zellen 45 sec Ultraschall behandelt (Intensität 4, ohne Kühlung). Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml Paraffinöl, das durch kräftiges Schütteln unter die Suspension gemischt wurde. Durch die anschließende Zentrifugation wurde die Probe in eine wässrige, die lipophoben vegetativen Zellen enthaltene Phase und in eine ölige, die lipophilen Sporen enthaltene Phase getrennt. 0,1 ml des Öluberstandes wurden auf eine VM-Platte verspatelt. Mit dem gleichen Spatel wurden noch weitere 3 - 4 Vollmedium-Platten bespatelt.

Nach 3 Tagen Bebrütung bei 30^o C wurden 200 haploide Klone in nummerierten Rastern auf VM-Platten überimpft.

2.6.3. Bestimmung der Atmungsfähigkeit

Durch Stempeln des Rasters auf eine Glycerin-Platte ließen sich die atmungsdefekten Klone identifizieren. Da diese nur Glucose, nicht aber Glycerin durch Gärung vermetabolisieren können, waren auf den Glycerin-Platten Lücken im Raster an den Stellen, wo sich auf der entsprechenden VM-Platte ein Klon, bestehend aus atmungsdefekten Zellen, befand.

2.6.4. Paarungstyp-Bestimmung

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurden die neu isolierten atmungskompetenten Haplonten mit je einem a- und einem α-Teststamm gekreuzt. Da nur Zellen mit entgegengesetztem Paarungstyp kopulieren, kann aufgrund der Zygotenbildung der Paarungstyp des Haplonten bestimmt werden. Auf diese Weise konnten gleichzeitig noch vorhandene diploide Kolonien entdeckt werden, da diese weder mit a- noch mit α-Haplonten kopulieren.

2.6.5. Test zur Bestimmung der photodynamischen Sensibilität

Von den neu isolierten Haplonten wurden für jeden Versuch zwischen 10 und 20 Klone abgeimpft und auf VM-Platten angezüchtet. Nach 3 Tagen Bebrütung wurden die Stämme abgewaschen und aufbereitet - wie unter 2.5.1. beschrieben. Anschließend wurden alle Stämme auf einen Titer von 1×10^4 Zellen/0,1 ml gebracht und 30 min in TP der Konzentration 10 µg/ml dunkel inkubiert. Nach erfolgter Einwirkzeit wurden je 0,1 ml Zellsuspension jedes Stammes mit einer Pipette senkrecht auf zwei Vollmedium-Platten so ausgestrichen, daß jede Platte pro Ausstrich 5×10^3 Zellen erhielt.

Auf diese Weise konnten auf jede Vollmedium-Platte die Ausstriche von 5 Stämmen gebracht werden. Anschließend wurde jeweils eine der Parallel-Platten 5 min mit sichtbarem Licht bestrahlt, während die andere als Kontrolle diente und unbestrahlt blieb.

Nach 3 Tagen Bebrütung konnten die Platten miteinander verglichen werden. Die Zellausstriche auf den unbestrahlten Kontrollplatten waren infolge des hohen Titers zu schmalen Zellrasen aufgewachsen, während die Zellen in den Ausstrichen auf den bestrahlten Platten je nach Sensibilität des Stammes unterschiedlich stark abgetötet waren. Das Zellbild dieser Ausstriche reichte von Rasenbildung bei unempfindlichen Stämmen über Koloniebildung bis zu völliger Abtötung aller Zellen bei sehr sensiblen Stämmen. Auf diese Weise wurden 100 Haplonten untersucht.

2.7. Versuchsauswertung und graphische Darstellung

2.7.1. Auswertung der Inaktivierungsexperimente

Nach Bebrütung der unbehandelten Kontrolle und der photodynamisch behandelten Proben wurden die auf Vollmedium-Platten aufgewachsenen Makrokolonien ausgezählt und zur Ermittlung der Überlebenden bei einer bestimmten Bestrahlungszeit herangezogen. Die Berechnung der Überlebensrate $S_{(x)}$ erfolgte nach der Gleichung:

$$S_{(x)} = \frac{N_S}{N_0} \qquad (1)$$

wobei N_S die Anzahl der die Behandlung überlebenden Zellen der ausgezählten Probe und N_0 die teilungsfähigen Zellen der ausgezählten Kontrolle angibt. Die so ermittelten Werte wurden im logarithmischen Maßstab über der Bestrahlungszeit aufgetragen und ergeben eine sogenannte Dosis-Effekt-Kurve (DEK), die das Maß für die Sensibilität eines Stammes bildet.

2.7.2. Bestimmung der Induktionsrate an Atmungsdefizienten

Die rho$^-$-Induktionsrate wurde in Prozent induzierte Atmungsdefekte pro behandelte Atmungskomponente angegeben. Die Berechnung basiert auf nachstehender Gleichung 2:

$$\%\delta^-_{ind} = \frac{R_o - \frac{R_s}{S_{(x)}}}{R_o} \times 100 \qquad (2)$$

R_o = Anzahl der atmungskompetenten Zellen (rho$^+$) in der unbehandelten Ausgangssuspension (Kontrolle)

R_s = Anzahl der überlebenden atmungskompetenten Zellen nach einer applizierten Dosis D (1 µg TP/ml + x min Bestrahlung)

$S_{(x)}$ = Überlebensrate der Gesamtpopulation, die sich aus rho$^+$-, spontanen rho$^-$- und induzierten rho$^-$-Zellen zusammensetzt

Bei der Aufstellung der Gleichung zur Berechnung des prozentualen Anteils induzierter Atmungsdefekte in einer photodynamisch behandelten Hefepopulation wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen:

- Die unbehandelte Ausgangssuspension enthält überwiegend atmungskompetente rho$^+$-Zellen, einen geringen Anteil spontaner rho$^-$-Zellen und keine (0 %) induzierten rho$^-$-Zellen.

- Der Anteil atmungskompetenter Zellen verringert sich zum einen durch photodynamische Inaktivierung, zum anderen durch die Umwandlung von rho$^+ \longrightarrow$ rho$^-$.

- Das Mutationsereignis $rho^+ \rightarrow rho^-$ aufgrund photodynamischer Behandlung soll als Induktion verstanden und rechnerisch erfaßt werden.

- Wenn durch photodynamische Behandlung tatsächlich Atmungsdefiziente induziert werden, sollte $R_0 > R_s/S_{(x)}$, wobei die Differenz $R_0 - R_s/S_{(x)}$ die Anzahl induzierter rho^--Zellen angibt.

2.7.3. Bestimmung der TP-induzierten Mutationsrate

Bei der Berechnung der Mutationsrate ist zu berücksichtigen, daß in einer unbehandelten Population teilungsfähiger auxotropher Hefezellen bereits eine bestimmte Zahl prototropher Zellen vorhanden ist, die den spontanen "Background" bilden (M_0). Werden durch photodynamische Behandlung Mutanten induziert, so setzt sich die Zahl der aufgewachsenen Mutanten (Ms) einer behandelten Probe aus überlebenden spontanen und induzierten Prototrophen zusammen. Gleichzeitig sollte mit zunehmender Bestrahlungszeit die Zahl induzierter Mutanten N_m gegenüber dem Anteil spontaner Mutanten zunehmen. Durch die photodynamische Behandlung werden auch Zellen inaktiviert, und zwar auxotrophe sowie spontane und induzierte Prototrophe in gleichem Maße, d.h. für alle Zellen gilt die gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit $S_{(x)}$. Schließlich kann bei andauernder Behandlung die induzierende Wirkung des PDE durch die letale Wirkung überlagert werden, so daß die Zahl der Mutanten wieder abnimmt.

Die Mutationsrate kann unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren entweder als Mutationsfrequenz $M_{(x)}$ oder als Mutantenertrag $Y_{(x)}$ angegeben werden.

2.7.3.1. Mutationsfrequenz

Die Berechnung der Mutationsfrequenz $M_{(x)}$, definiert als Zahl der Mutanten unter den überlebenden Zellen bei der Dosis D, erfolgte nach Gleichung 3:

$$M_{(x)} = \frac{M_s - M_o \quad S_{(x)}}{N_s} = \frac{N_m}{N_s} \qquad (3)$$

M_o = Anzahl der spontanen Prototrophen in der unbehandelten Ausgangssuspension

M_s = Anzahl der überlebenden spontanen und induzierten Prototrophen nach einer applizierten Dosis D

N_m = Anzahl der induzierten Prototrophen nach einer applizierten Dosis D

Die ermittelten Werte wurden logarithmisch über der Bestrahlungszeit aufgetragen.

2.7.3.2. Mutantenertrag

Die sogenannte Yield-Funktion zur Berechnung des Mutantenertrages beschreibt gleichzeitig die mutagene und letale Wirkung eines Mutagens:

$$M_{(x)} \cdot S_{(x)} = \frac{M_s - M_o \cdot S_{(x)}}{N_o} = Y_{(x)} = \frac{N_m}{N_o} \qquad (4)$$

Der Yield $Y_{(x)}$ ist definiert als Zahl der Mutanten pro behandelte Zellen. Die Werte können entweder logarithmisch über der Bestrahlungszeit oder doppeltlogarithmisch über den letalen Treffern aufgetragen werden. Zur Berechnung der Letaltrefferdosis konnte die Poisson-Verteilung herangezogen werden.

Die Poisson-Verteilung ist die Formel für die Wahrscheinlichkeit seltener Ereignisse:

$$P_{(x)} = e^{-m} \cdot \frac{m^x}{x!} \qquad (5)$$

$P_{(x)}$ = Wahrscheinlichkeit eines seltenen Ereignisses x
m = durchschnittliche Zahl der Treffer pro Zelle, die notwendig sind, einen Letalschaden hervorzurufen
x = Anzahl der Letalschäden pro Zelle

Die Wahrscheinlichkeit, daß bei durchschnittlich einem Letaltreffer pro Zelle kein Letalschaden in einer behandelten Hefezelle auftritt (x = 0; m = 1), beträgt demzufolge $P_{(o)} = e^{-1} = 0{,}37$. Dieser Wahrscheinlichkeitswert, bezeichnet als LD_{37}, gibt die Dosis an, bei der 37 % der behandelten Zellpopulationen ohne Treffer bleibt (bzw. alle Schäden repariert hat) und der Rest durchschnittlich durch einen Treffer letal geschädigt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die photodynamische Sensibilität der Stämme

Inaktivierungseffekte wie z.B. Strahleneffekte, Effekte chemischer Behandlungen und auch der PDE können quantitativ in Form von Dosis-Effekt-Kurven erfaßt werden. Hierbei trägt man den Anteil der Überlebenden logarithmisch gegen die applizierte Dosis auf. Inkubiert man die Stämme während der stationären Wachstumsphase 30 min im Dunkel in Thiopyronin der Konzentration 10 µg/ml Lösung und bestrahlt anschließend additiv mit sichtbarem Licht, so erhält man die Dosis-Effekt-Kurven (DEK) für die stammspezifische Sensibilität der Stämme gegenüber dem PDE unter Standardbedingungen.

Abbildung 2 zeigt die DEK für die Sensibilität des Koloniebildungsvermögens der vier untersuchten haploiden Saccharomyces-Stämme nach photodynamischer Behandlung. Die Auftragung der Werte erfolgte - wie auch bei allen anderen nachfolgend erstellten DEK - im halblogarithmischen Maßstab, so daß exponentielle Kurventeile als Gerade erscheinen. Die einzelnen Kurvenwerte sind gut abgesichert, da sie aus mindestens fünf unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gemittelt wurden.

Alle DEK der photodynamisch behandelten Stämme zeigen eine deutliche Dosisabhängigkeit, d.h. die photodynamische Inaktivierung der Koloniebildungsfähigkeit von Saccharomyces cerevisiae ist abhängig von der Bestrahlungsdosis und nimmt entsprechend der Dauer der Bestrahlungszeit zu.

a) Relative Lage der Dosis-Effekt-Kurven

Aus der relativen Lage der Überlebenskurven zueinander ist zu ersehen, daß die einzelnen Stämme jeweils charakteristische Kurvenverläufe zeigen, ein Beweis für die unterschiedliche photodynamische Sensibilität der vier Saccharomyces-

Stämme. So erweist sich Stamm 235-11 c als ausgesprochen resistent gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP, während Stamm 211-1 aM hochsensibel ist. Die zu Stamm 235-11 c isogenen strahlensensiblen rad-Stämme 2121-140 rad 9 und 2105-15 rad 2 zeigen demgegenüber eine mittlere Sensibilität, wobei sich Stamm 2121-140 als etwas resistenter erweist. Vergleicht

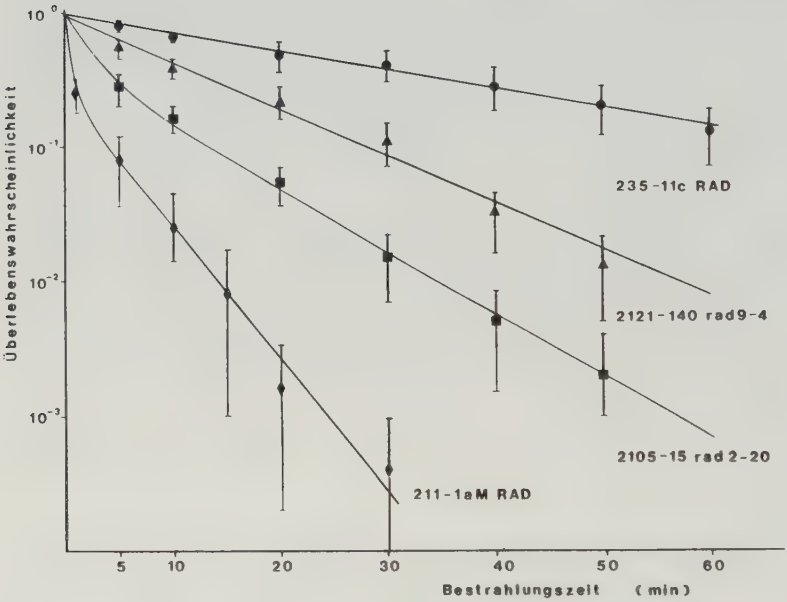


Abb. 2.: Dosis-Effekt-Kurven der Saccharomyces cerevisiae Stämme 235-11 c, 2121-140, 2105-15 und 211-1 aM nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin: 10 µg/ml; 30 min Dunkelwirkung (DW); Bestrahlung mit sichtbarem Licht (500 Watt Glühlampe).

man die LD_{10}, also die Dosis, die benötigt wird, um das Oberleben der Stämme auf 10 % zu reduzieren, so erhält man die in Tabelle 1 eingetragenen Werte. Diese besagen, nach wieviel Minuten Bestrahlung mit sichtbarem Licht die Oberlebensrate 10 % beträgt.

Tabelle 1: Vergleich der Bestrahlungszeiten in Minuten, die bei den Stämmen zu 10 % Oberlebensrate führen

	235-11 c	2121-140	2105-15	211-1 aM
LD_{10}	67	27	13	5

b) Kurvenverlauf

- Die DEK vom Stamm 235-11 c zeigt einen exponentiellen Kurvenverlauf. Die Oberlebensrate in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit sinkt infolge des resistenten Verhaltens des Stammes gegenüber photodynamischer Behandlung nur langsam, so daß sich die Kurve durch einen extrem flachen Abfall auszeichnet.

- Die DEK vom Stamm 2121-140 zeigt nach Applizierung niedriger Strahlendosen (was einer Bestrahlungszeit von 0 - 20 min entspricht) in ihrem Verlauf einen sogenannten Bauch (ECKARDT, 1974), an den sich ab 20 % Oberlebensrate ein exponentieller Kurventeil anschließt.

- Die DEK vom Stamm 2105-15 weist ebenfalls einen Bauchteil auf, der ab 10 % Oberlebensrate in einen exponentiellen Abfall übergeht.
  Charakteristisch für beide rad-Stämme ist ein paralleler Kurvenverlauf bei niedrigen Oberlebensraten.

- Die DEK vom Stamm 211-1 aM ist gekennzeichnet durch einen Bauch im Bestrahlungszeitraum von 0 - 5 min und einen steilen exponentiellen Kurventeil ab 10 % Überlebensrate, verursacht durch die hohe Sensibilität des Stammes gegenüber dem PDE.

3.2. Einfluß unterschiedlicher Vorkulturbedingungen auf die photodynamische Sensibilität der Stämme

3.2.1. Problemstellung

Mikrobiologische Untersuchungen an Saccharomyces cerevisiae, die im Rahmen unterschiedlicher Problemstellungen durchgeführt wurden, hatten den Einfluß der Umweltbedingungen auf das Untersuchungsergebnis zum Thema. Dabei zeigte sich, daß gerade so willkürlich zu beeinflussende Faktoren wie die Medienzusammensetzung der Vor- und Nachkultur, d.h. die Verwendung verschiedener Substanzen oder deren unterschiedliche Konzentrierung und der pH-Wert von Bedeutung sind.

LASKOWSKI und SCHÄDEL stellten fest, daß die Anzucht eines Isoleucin-Valin-bedürftigen, diploiden Wildtypstammes auf einem Medium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen einen Einfluß auf die Überlebensrate nach Röntgenbestrahlung hat. Diese lag umso höher, je kleiner die Glucosekonzentration war. Auch ein Einfluß der Hefeextraktkonzentration im Vorkulturmedium auf die Röntgenstrahlensensibilität konnte nachgewiesen werden. Von gleicher Bedeutung war die Wahl der Nachkultur. Das Plattieren der bestrahlten Zellen auf einem synthetischen Medium, angereichert mit 18 Aminosäuren, führte gegenüber der normalerweise verwendeten VM-Nachkultur zu einem Resistenzgewinn. Dagegen wurde nach Aufzucht der bestrahlten Zellen auf einem angesäuerten Medium (pH 3,7 gegenüber normal pH 6,5) die Strahlenresistenz des Stammes reduziert (SCHÄDEL and LASKOWSKI, 1967; LASKOWSKI and SCHÄDEL, 1968).

Da die Einflußnahme durch Variationen äußerer Bedingungen auf das System Zelle spezifischer Art sein muß, haben sich andere Autoren speziell mit den cytologischen und biochemisch auftretenden Veränderungen innerhalb der Zelle nach deren Anzucht unter unterschiedlichen Vorkulturbedingungen beschäftigt.

So stellte man eine starke Einflußnahme der Medienkomposition auf Natur und Gehalt an Pigmenten, Enzymen (LUKINS et al., 1966) und Lipiden (JOLLOW et al., 1968) fest. Bestimmende Faktoren von biochemischen und cytologischen Eigenschaften der aufwachsenden Zellen sind die Verfügbarkeit von Sauerstoff, das Vorhandensein ungesättigter Fettsäuren und die Art und Konzentration der Kohlehydratquelle im Wachstumsmedium (JAYARAMAN et al., 1966). Die Lipid-Matrix spielt eine entscheidende Rolle bei Bildung und Funktion cytoplasmatischer Membransysteme (JOLLOW et al., 1968).

Einen besonderen Einfluß auf die Zellmorphologie und -physiologie hat die Verfügbarkeit und Konzentration der Glucose. Dieser von SLONIMSKI (1955) und EPHRUSSI (1956) als erster beschriebene "Glucose-Effekt" wird als Glucose-Repression bezeichnet. Mit steigendem Glucosegehalt im Medium findet eine Umstellung der fakultativ anaeroben Hefezellen von Atmung auf Gärung statt. Andererseits wird bei geringer Glucosekonzentration oder dem Angebot einer nicht fermentierbaren Kohlehydratquelle das Atmungsenergie liefernde System aktiviert (POLAKIS and BARTLEY, 1965; JAYARAMAN et al., 1966; PERLMAN and MAHLER, 1973). Danach ist die Mitochondrienzahl pro Zelle abhängig von der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium und beträgt bei einer Konzentration von 5 % zwischen 3 - 8 Mitochondrien gegenüber 10 - 20 bei Angebot von 1 % Glucose oder einer nicht fermentierbaren Kohlehydratquelle (WALLACE et al., 1968; STEVENS, 1974). Abbau oder Synthese der Mitochondrien sind das Ergebnis einer Anzahl spezifischer biochemischer Prozesse, die durch die Glucosekonzentration oder bestimmte Kohlehydratgaben im Wachstums-

medium beeinflußbar sind, so z.B. der mitochondriale DNA-Gehalt (BLEEG et al., 1972), die Synthese bestimmter mitochondrialer Membranproteine (MIAN et al., 1973) und die spezifische Aktivität der Cytochrom-Oxidase und anderer mitochondrialer Enzyme (PERLMAN and MAHLER, 1974). So ist der mitochondriale Enzymgehalt an Fumarase, Malat-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase ebenfalls höher bei Zellen, die auf einem 1 %igen Glucose-Vorkulturmedium angezogen wurden als bei Zellen auf einem 5 %igen Glucosemedium (CLARK-WALKER and LINNANE, 1967). Nach GOLDTHWAITE hat die Vorkultur-Kohlehydratquelle einen Einfluß auf die cytoplasmatische Vererbung. Danach ist die Übertragungshäufigkeit mitochondrialer Marker bei Anzucht der Elternstämme auf einem Glycerinmedium am größten und am geringsten nach Kultivierung auf Glucosemedium (GOLDTHWAITE et al., 1974). Nicht nur die Art und die Konzentration der Kohlehydratquelle, auch die Verfügbarkeit von Sauerstoff während der Vorkultivierung übt einen Einfluß auf die Zellkomposition aus. Die cytologisch undifferenzierteste Zelle ist die unter anaeroben Verhältnissen auf Glucose-Medium angezüchtete Zelle. Sie besitzt eine Plasmamembran, eine fragmenthafte Kernmembran, eine sehr kleine Vakuole, fast keine cytoplasmatischen Membransysteme und keine Mitochondrien (WALLACE et al., 1968).

Ergebnisse wie diese lassen darum vermuten, daß die Zellphysiologie auch für das Ausmaß einer photodynamischen Schädigung mitbestimmend sein kann. Eine durch Variation der Vorkulturbedingungen geschaffene Einflußnahme auf das Zellwachstum könnte zu Modifikationen der Zellmorphologie führen, aufgrund derer die Zelle mehr oder weniger sensibel für eine photodynamische Behandlung würde. So könnte z.B. eine induzierte Permeabilitätsänderung an der Zellmembran Einfluß auf die Aufnahmegeschwindigkeit des Farbstoffs ausüben. Geringfügige Änderungen an molekularen Grundbausteinen von Zellorganellen oder zellulären Makromolekülen könnten die Bindungseigenschaften zwischen

Farbstoff und Substrat beeinflussen und dadurch die innerzelluläre Farbstoffkonzentration.

In vitro Versuche mit den häufig in Psychopharmaka Verwendung findenden Phenothiazin-Derivaten haben gezeigt, daß nach Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Wellenlängen > 305 nm als Endprodukt der photochemischen Reaktion Sulfoxide entstehen. Deren Produktion kann jedoch unter anaeroben Versuchsbedingungen vollständig verhindert werden (DECUYPER et al., 1982).

3.2.2. Photodynamische Sensibilität der Stämme nach Variation der Glucose-Konzentration im Vorkultur-Medium

Abbildung 3 zeigt die Dosis-Effekt-Kurven der vier untersuchten Stämme für die Sensibilität des Koloniebildungsvermögens nach photodynamischer Behandlung mit TP und nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen. Jeder Kurvenwert basiert auf drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Überlebensrate nimmt in allen Fällen mit der Dauer der Bestrahlungszeit ab. Alle vier untersuchten Stämme weisen deutliche Sensibilitätsschwankungen in ihrem Kurvenverlauf auf. Da die Versuchsrechenbedingungen wie TP-Konzentration, Einwirk- und Bestrahlungszeit während der photodynamischen Versuchsdurchführung konstant gehalten wurden, sind diese Schwankungen zweifelsfrei durch die unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in der Vorkultur induziert worden.

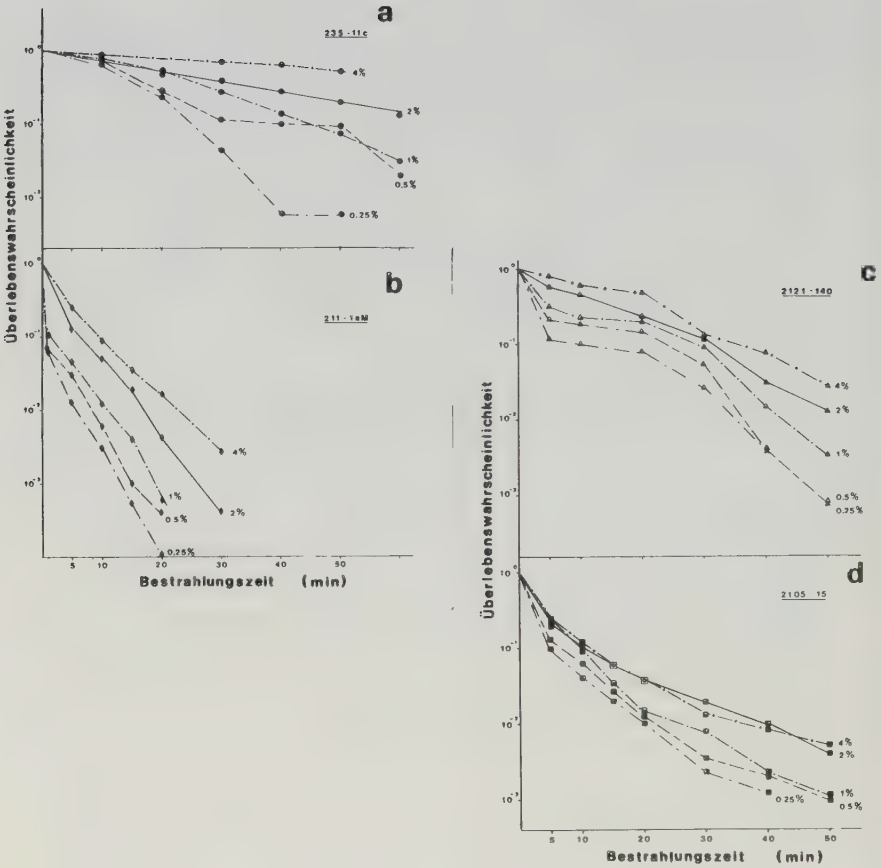


Abb. 3.: DEK nach Anzucht der Stämme 235-11 c (a), 211-1 aM (b), 2121-140 (c), 2105-15 (d) auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen und anschließender photodynamischer Behandlung.

Man erkennt, daß bei einem Glucosegehalt von weniger als 2 % - wobei dieser den Standardwert darstellt - die Zellen an Empfindlichkeit gegenüber photodynamischer Behandlung zunehmen. Die Sensibilität ist umso größer, je kleiner die Glucosekonzentration in der Vorkultur war. Dies gilt für alle vier

untersuchten Stämme gleichermaßen. Verdoppelt man dagegen die Konzentration der Standardvorkultur auf 4 %, so schafft das für drei der Stämme zusätzlich einen Resistenzgewinn. Die DEK liegen nach diesen Anzuchtbedingungen deutlich über der Standardkurve. Bei Stamm 2101-15 dagegen hat eine höher konzentrierte Vorkultur keinen Einfluß auf die Empfindlichkeitsverhältnisse. Standardkurve und DEK nach Anzucht auf doppelt konzentrierter Vorkultur haben etwa den gleichen Verlauf.

Abbildung 4 zeigt die Resistenzveränderungen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium. Hierbei wurde die jeweilige LD_{10}, also die Dosis, bei der 10 % der Zellen noch Kolonien bilden können,als Funktion der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium dargestellt.

Obwohl alle vier untersuchten Stämme bei steigender Glucosekonzentration im Vorkulturmedium einen Resistenzgewinn gegenüber photodynamischer Behandlung erlangen, zeigt Abbildung 4 deutlich die Effektivität dieser äußeren Einflußnahme.

Nach Anzucht der Stämme 235-11 c und 211-1 aM auf einem Vorkulturmedium mit einem Glucosegehalt von 0,25 % ist zur photodynamischen Behandlung eine Bestrahlungszeit von ca. 25 min bei Stamm 235-11 c und von ca. 1 min bei Stamm 211-1 aM ausreichend, um das Überleben der Stämme auf 10 % zu reduzieren. Bei Erhöhung der Glucosekonzentration auf 4 % im Vorkulturmedium muß die anschließende Bestrahlungszeit bei Stamm 235-11 c auf ungefähr 70 min ausgedehnt werden und bei Stamm 211-1 aM auf 9 min, um die gleiche Inaktivierungsrate wie oben zu erhalten. Das bedeutet, daß nach Erhöhung der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium von 0,25 % auf 4 % die Strahlendosis zur Setzung eines gleichwertigen photodynamischen Schadens in der Zelle ebenfalls erhöht werden muß, und zwar bei Stamm 235-11 c um das 2,5-fache, bei Stamm 211-1 aM sogar um das 9-fache.

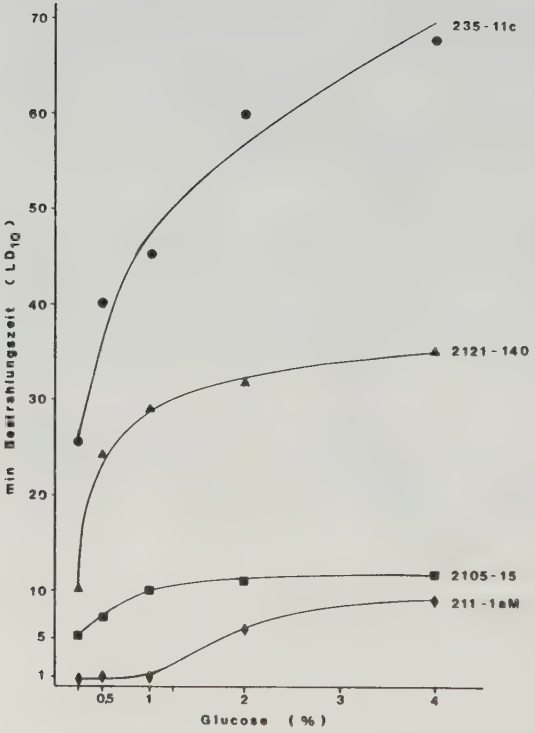


Abb. 4.: LD_{10} (nach TP-Dunkelinkubation notwendige Bestrahlungszeit in min, die zu 10 % Überlebenden führt) der Stämme 235-11 c, 2121-140, 2105-15 und 211-1 aM in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium.

Als Maß für die photodynamische Sensibilisierung eines Stammes nach Anzucht auf unterschiedlich konzentriertem Vorkulturmedium kann der Dosis-Modifikations-Faktor (DMF) verwendet werden. In Tabelle 2 ist er definiert als das Verhältnis der Dosis, die benötigt wird, um das Überleben eines Stammes nach Anzucht unter Standard-Vorkulturbedingungen (2 % Glucose) auf die Überlebensrate (ü) der LD_{10} zu reduzieren, zu der Dosis, die benötigt wird, um das Überleben des gleichen Stammes nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen auf das gleiche ü (LD_{10}) zu reduzieren:

$$DMF = \frac{LD_{10} \text{ (Anzucht auf 2 \% Glucose-Medium)}}{LD_{10} \text{ (Anzucht auf x \% Glucose-Medium)}}$$

Die Werte der Tabelle 2 zeigen, daß bei Anzucht der Stämme unter gleichen Vorkulturbedingungen die Empfindlichkeitsverhältnisse gegenüber photodynamischer Behandlung bezogen auf Standardbedingungen bei den Stämmen in etwa gleich sind: Durch Verringerung der Standard-Glucosekonzentration im Vorkulturmedium (< 2 %) kann bei allen Stämmen die Sensibilität gegenüber dem PDE erhöht werden (DMF > 1); bei Konzentrationen, die über dem Standardwert liegen (> 2 %), erfahren zumindest drei der untersuchten Stämme einen deutlichen Sensibilitätsverlust (DMF < 1).

Tabelle 2: Dosis-Modifikationsfaktoren der Stämme nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen

Glucosekonzentration	235-11 c	2105-15	2121-140	211-1 aM
0,25 %	2,35	2,20	3.15	7,5
0,50 %	1,50	1,57	1,31	6,6
1,00 %	1,33	1,10	1,08	6,0
4,00 %	0,88	0,96	0,90	0,5

3.2.3. Photodynamische Sensibilität nach Stamm-Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen

Eine weitere, durch äußere Bedingungen geschaffene Einflußnahme auf die Wachstumsbedingungen der Zellen ist das Angebot der Kohlehydratquelle im Vorkulturmedium. Dieses bietet sich an aus Gründen der Komplexität des Kohlehydratstoffwechsels sowohl auf dem Niveau der Umwandlung der Kohlehydrate in zelleigene Bestandteile als auch für abbauende Reaktionen zur Energiegewinnung. Führt man der Vorkultur anstelle der sonst üblicherweise angebotenen Glucose ein anderes Kohlehydrat zu, so wird das eine entsprechende Änderung in bestimmten Stoffwechselschritten induzieren, was eine Anpassung der Zellen gegenüber den veränderten Wachstumsbedingungen entspricht. Dazu gehört z.B. die enzymkatalysierte Hydrolyse von Mehrfachzuckern und die damit verbundene Synthese der entsprechenden Glykosidasen. Auch die Umwandlung der Zucker ineinander ist eine Stoffwechselleistung, die es der Zelle ermöglicht, bei einseitigem Kohlehydratangebot ihren Bedarf an unterschiedlichen Zuckern sicherzustellen.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde Glucose im Vorkulturmedium in gleicher Konzentration (2 %) durch drei Disaccharide verschiedenen Typs ersetzt; durch Saccharose, ein nicht reduzierendes Disaccharid sowie durch Maltose und Lactose, zwei Disacchariden des reduzierenden Typs. Entsprechend ihrer molekularen Grundstruktur setzen alle drei Zucker nach enzymatischer Spaltung Glucose frei, und zwar Saccharose je ein Molekül Glucose und ein Molekül Fructose; Maltose je zwei Moleküle Glucose und Lactose, je ein Molekül Glucose und ein Molekül Galactose. Bei allen freigesetzten Zuckern handelt es sich um Hexosen, wobei Fructose als einzige Ketose in der unbeständigen furanoiden 5-Ringform vorliegt.

Abbildung 5 zeigt die DEK der Stämme nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen und anschließender photodynamischer Behandlung mit TP.

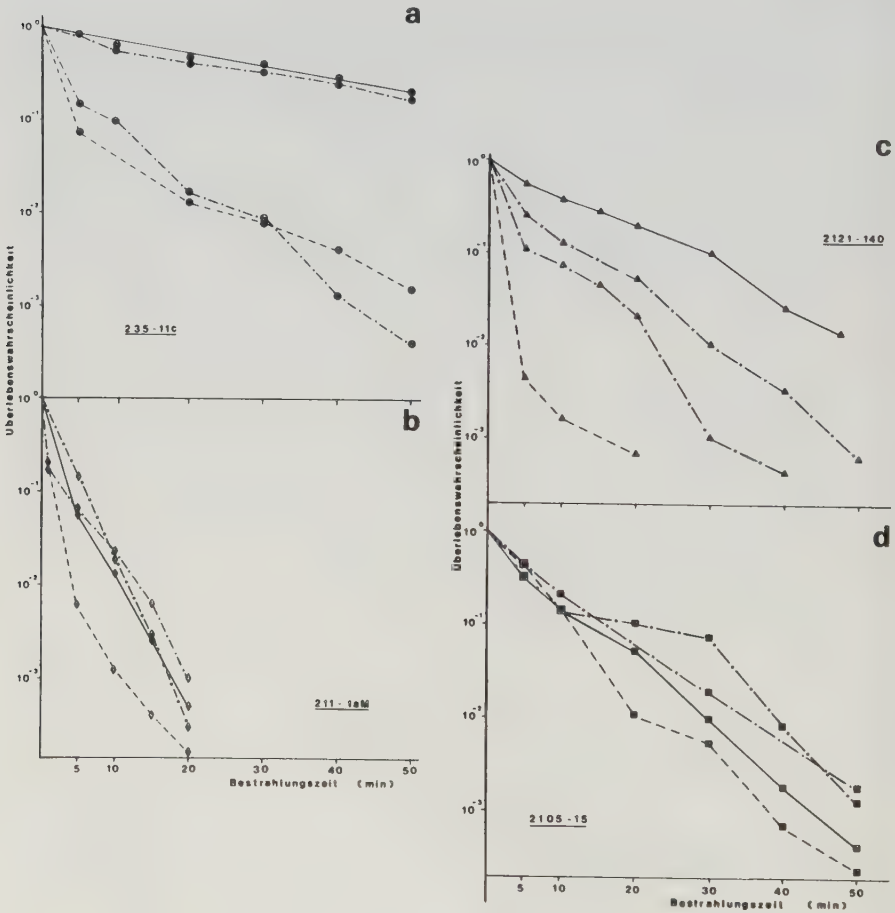


Abb.5.: DEK nach Anzucht der Stämme 235-11 c (a), 211-1 aM (b), 2121-140 (c) und 2105-15 (d) auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen und anschließender photodynamischer Behandlung. Es bedeutet ⊢—⊣ Glucose; ⊢•-•-•⊣ Saccharose; ⊢---⊣ Lactose; ⊢x-x-x⊣ Maltose.

Die bei den Stämmen unterschiedlich stark auftretenden Sensibilitätsschwankungen zeigen eindeutig den Einfluß der Vorkultur auf die stammspezifische Überlebensrate nach photodynamischen Inaktivierungsversuchen. Ein Vergleich der DEK der Stämme verdeutlicht den unterschiedlichen Einfluß der Anzuchtbedingungen auf die photodynamische Inaktivierungsrate. Während sich die Inaktivierungskurven der Stämme 211-1 aM und 2105-15 nach Anzucht auf Saccharose-, Maltose- und Lactose-Medium ziemlich eng um die Standardkurve scharen, wird Stamm 235-11 c nach Lactose- und Maltose-Anzucht stark sensibel gegenüber dem PDE, wobei der Resistenzverlust unter beiden Vorkulturbedingungen etwa gleich ist. Stamm 2121-140 dagegen erfährt nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit den drei angebotenen Kohlehydraten einen gleichmäßigen Sensibilitätszuwachs gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP, wie aus der Aufteilung der Kurvenschar ersichtlich wird. Dabei verursacht Anzucht auf Maltose- und Saccharose-Medium eine mittlere Sensibilität verglichen mit Standardbedingungen; nach Lactose-Anzucht wird der Stamm hochsensibel.

Anders als bei der Glucosekonzentrations-abhängigen Inaktivierungsrate, bei der durch Verringerung der Glucosekonzentration im Vorkulturmedium bei allen Stämmen gleichermaßen eine zunehmende Sensibilisierung gegenüber photodynamischer Behandlung induziert werden kann, läßt die Anzucht auf Vorkulturmedien mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen keine Gemeinsamkeiten nach photodynamischer Behandlung der Stämme erkennen. So ist der Einfluß des gleichen Vorkulturzuckers auf die Überlebensrate der einzelnen Stämme ganz unterschiedlich, d.h. die Anzucht der Stämme auf einem Vorkulturmedium mit gleicher Kohlehydratquelle induziert bei dem einen Stamm einen Resistenzgewinn gegenüber photodynamischer Behandlung, während ein anderer Stamm einen Resistenzverlust erfährt.

Die in Tabelle 3 aufgezeigten DMF veranschaulichen den Einfluß der Kohlehydrate auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit der einzelnen Stämme. Hierbei bedeutet ein DMF < 1 wiederum einen Resistenzgewinn gegenüber dem PDE verglichen mit Standardbedingungen; ein DMF > 1 zeigt dagegen einen Resistenzverlust an.

Tabelle 3: Dosis-Modifikationsfaktoren der Stämme nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Kohlehydratgaben

Vorkultur-Kohlehydrat	235-11 c	2105-15	2121-140	211-1 aM
Saccharose	1,10	0,60	5,00	0,66
Maltose	7,44	0,79	2,40	1,33
Lactose	16,75	1,08	15,00	2,00

Als einzige Vorkultur-Kohlehydratquelle führt Lactose bei allen Stämmen zu einem photodynamischen Resistenzverlust, der in besonders hohem Maß die Stämme 235-11 c und 2121-140 betrifft. Verwendet man anstelle von Glucose Saccharose im Vorkulturmedium, so erlangen die Stämme 211-1 aM und 2105-15 einen Resistenzgewinn, die Stämme 235-11 c und 2121-140 dagegen einen Resistenzverlust gegenüber photodynamischer Behandlung. Anzucht auf einem Maltose-haltigen Vorkulturmedium erhöht bei den Stämmen 235-11 c, 2121-140 und 211-1 aM die photodynamische Sensibilität, Stamm 2105-15 erfährt dagegen einen Sensibilitätsverlust.

3.2.4. Abhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung vom pH-Wert des Suspensionspuffers

Von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Stoffwechselvorgänge, zu denen auch der Stofftransport zählt, ist die Wasserstoffionen-Konzentration im Innen- sowie im Außenmilieu der Zellen. Am aktiven Transport von Stoffen durch die Zellmembran sind Enzyme, sogenannte Carrier, beteiligt, deren spezifische Eigenschaften meist nur in einem bestimmten pH-Bereich zur Wirkung kommen. Eine Änderung des pH-Optimums führt häufig zur Entladung des aktiven Zentrums am Enzym und damit verbunden zu einer Konfigurationsänderung des Proteins, wodurch dieses seine Fähigkeit verliert, mit einem bestimmten Substrat zu binden. Gleichzeitig kann die Änderung der Raumstruktur der in der Zellmembran lokalisierten Proteine zu einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran führen. Auch bei der photodynamischen Inaktivierung durch bestimmte Farbstoffe kommt dem pH-Wert des Inkubations- bzw. Reaktionsgemisches offensichtlich eine besondere Bedeutung zu.

So konnte gezeigt werden, daß Trypsin bei einem pH-Wert unter 6 unempfindlich gegenüber photodynamischer Behandlung mit Methylenblau und Eosin ist (GLAD and SPIKES, 1966). Die Photooxidation von Purin- und Pyrimidinbasen durch Hematoporyphyrin ist ebenfalls pH-Wert-abhängig. So erweisen sich bei einem pH-Wert $>$ 10 alle Basen als photodynamisch sensibel, dagegen ist bei einem physiologischen pH-Wert nur Guanin photooxidierbar (DUBBELMAN et al., 1982).

MOORE und HEMMENS (1982) konnten nachweisen, daß eine pH-Wert-abhängige Photooxidation von Histidin, Tryptophan oder Xanthin durch bestimmte Anti-Malaria-Drogen stattfindet, wobei einige Drogen bei einem pH-Wert $<$ 4 und andere Drogen bei einem pH-Wert $>$ 9 photodynamisch wirksam sind.

Die oben genannten Gründe deuten darauf hin, daß eine Abänderung des extrazellulären pH-Optimums auch die farbstoffsensibilisierte photodynamische Zellinaktivierung mit Thiopyronin beeinflussen kann. Dieses bietet sich sowohl auf dem Niveau der Farbstoffaufnahme und -bindung an, als auch auf dem Niveau des Nährstofftransportes. So könnte einerseits eine beschleunigte bzw. reduzierte Farbstoffaufnahme als Folge der pH-Wert-abhängigen Permeabilitätsänderung der Zellmembran eintreten. Da die photodynamische Inaktivierung des Koloniebildungsvermögens von Saccharomyces cerevisiae auch von der Farbstoffkonzentration in der Zelle abhängig ist, könnte dieser Effekt die stammspezifische Inaktivierungsrate beeinflussen. Andererseits könnte bei gleicher Farbstoffkonzentration in den Zellen die photodynamische Inaktivierungsrate durch ein reduziertes Nährstoffangebot erhöht werden.

Eine Modifikation der extrazellulären H^+-Ionenkonzentration kann auf einfache Weise durch pH-Wert-Variation des Suspensionspuffers erreicht werden. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde der für Saccharomyces cerevisiae optimale Puffer-pH von 4,6 ins Alkalische verschoben. Dafür wurden je vier Suspensionspuffergemische mit unterschiedlichen H^+-Ionenkonzentrationen hergestellt, deren pH-Skala von leicht sauer (pH 6) über neutral (pH 7) bis alkalisch (pH 8, pH 9) reichten. Nach Anzucht auf Standard-Vorkulturmedium wurden die Stämme mit dem entsprechenden pH-Wert abgewandelten Puffer gewaschen, suspendiert und eine Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Inkubation in TP-Lösung und anschließende Bestrahlung erfolgte in der gleichen Pufferlösung.

Die Abbildung 6 zeigt die Dosis-Effekt-Kurven der Stämme nach Abänderung des extrazellulären pH-Optimums und anschließender photodynamischer Behandlung mit TP. Als Zeichen der äußeren Einflußnahme auf die stammspezifische photodynamische Sensibilität treten auch hier bei allen Stämmen

die von der Standardkurve abweichenden pH-Wert-abhängigen DEK auf.

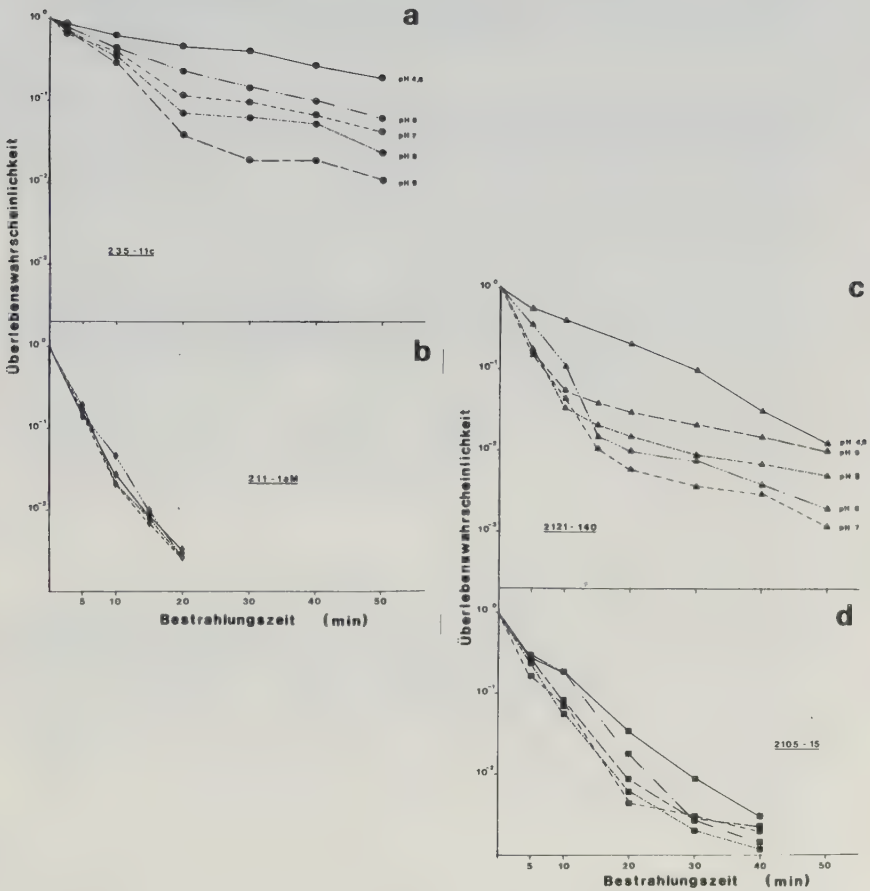


Abb. 6.: DEK nach Aufarbeitung und 60 min Inkubation der Stämme 235-11 c (a), 211-1 aM (b), 2121-140 (c) und 2105-15 (d) in Puffer mit unterschiedlichen H^+-Ionenkonzentrationen und anschließender photodynamischer Behandlung. Es bedeutet: ⊢——⊣ pH 4,6; ⊢— - - —⊣ pH 6; ⊢- -⊣ pH 7; ⊢•-•-•⊣ pH 8.

Die Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP in Abhängigkeit vom pH des Suspensionspuffers ist am geringsten bei Stamm 211-1 aM. Stamm 2105-15 zeigt einen geringen gleichbleibenden Resistenzverlust unabhängig vom Puffer-pH - wie aus den DMF der Tabelle 4 ersichtlich.

Am deutlichsten zeigt sich der Einfluß der Puffer H^+-Ionenkonzentration auf die Sensibilität des Koloniebildungsvermögens nach photodynamischer Behandlung mit TP bei den Stämmen 2121-140 und 235-11 c. Während die Suspendierung in Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert die Resistenz von Stamm 2121-140 gegenüber photodynamischer Behandlung besonders im niedrigen Dosisbereich (bis zu 10 min Bestrahlung) stark reduziert, erfährt Stamm 235-11 c eine gleichmäßige Sensibilitätszunahme über den gesamten Dosisbereich. Dabei zeigt Stamm 235-11 c als einziger eine streng pH-Wertabhängige Sensibilitätszunahme, wonach die Empfindlichkeit gegenüber dem PDE mit Verlagerung des Puffer pH-Wertes vom sauren in den alkalischen Bereich zunimmt.

Die anderen Stämme weisen nach oben genannter Pufferbehandlung starke Sensibilitätsschwankungen nach photodynamischer Behandlung auf, so daß es bei den pH-Wert-abhängigen Dosis-Effekt-Kurven Überschneidungen gibt, die den Schluß einer pH-Wert-abhängigen Resistenzabnahme bei den Zellen nicht zulassen, sondern nur den einer allgemeinen Einflußnahme der H^+-Ionenkonzentration auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten der Stämme.

Tabelle 4: Dosis-Modifikationsfaktoren der Stämme nach Aufarbeitung und Suspendierung in Puffer mit unterschiedlichen H^+-Ionenkonzentrationen

Puffer-pH	235-11 c	2105-15	2121-140	211-1 aM
pH 6	1,67	1,12	2,94	-
pH 7	2,23	1,75	4,61	1,4
pH 8	3,72	1,75	4,61	-
pH 9	4,32	1,55	4,00	-

Die in Tabelle 4 aufgeführten Dosismodifikationsfaktoren scheinen diese Vermutung zu bestätigen.

3.2.5. Einfluß von Atmung und Gärung auf die photodynamische Sensibilisierung

Zieht man Hefezellen auf einem Standard-Vorkulturmedium unter Sauerstoffentzug an, so werden die Zellen gezwungen, ihren Energiebedarf durch den anaeroben Kohlehydratabbau der Glycolyse zu decken. Auch hier wirkt die Änderung der Umweltbedingungen direkt auf das Stoffwechselgeschehen der Zellen, indem als Folge des Sauerstoffmangels der aerobe Stoffwechsel eingestellt wird. Die damit verbundenen intrazellulären Veränderungen wie z.B. die Modifikation bestimmter Membransysteme (JOLLOW et al., 1968) oder die Reduktion der Mitochondrien sollten nicht ohne Einfluß auf die photodynamische Inaktivierungsrate der Zellen sein.

Beeinflußt man dagegen die Zellen durch Anzucht auf Glycerinmedium dahingehend, ihren Energiebedarf allein durch den aeroben Kohlehydratabbau zu decken, so werden die mit dem Atmungsstoffwechsel in Beziehung stehenden Zellkomponenten und Enzymsysteme aktiviert und z.T. auch vermehrt (JAYARAMAN et al., 1966). Die atmungsaktive Zelle weist demzufolge eine andere physiologische Konstitution auf, als die zur Gärung gezwungene Zelle. Die durch bestimmte Umweltbedingungen induzierten cytoplasmatischen Unterschiede bei gleichen Stämmen könnten eine unterschiedliche Reaktion der Zellen gegenüber dem PDE zur Folge haben.

So könnten Farbstoff-Substrat-Bindung betreffende molekulare Veränderungen an Zellorganellen und löslichen Proteinen oder auch ein Mangel an Farbstoff bindenden Zellkomponenten das Verhalten der Stämme gegenüber dem PDE ebenso beeinflussen wie die zu geringe Verfügbarkeit an molekularem Sauerstoff in der Zelle.

Die Abbildung 7 zeigt die Dosis-Effekt-Kurven für die photodynamische Sensibilität des Koloniebildungsvermögens der vier untersuchten Stämme nach Anzucht unter Standard-Vorkulturbedingungen (VM), nach Anzucht unter Sauerstoffentzug (AN) und nach Anzucht auf Glycerinmedium (GM).

Während die Stämme 211-1 aM und 2105-15 durch ihre Anzucht im sauerstoff-freien Vorkulturmilieu einen deutlichen Resistenzgewinn gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP erfahren, zeigen die DEK der Stämme 235-11 c und 2121-140 nach Anzucht unter gleichen Vorkulturbedingungen eine Sensibilitätserhöhung an.

Die als Anpassung der Zellen auf ihre Umweltbedingungen erfolgte Umstellung von Atmung auf Gärung verschafft damit zwei Stämmen einen nachweisbaren Überlebensvorteil gegenüber dem PDE.

Auffällig ist der bei allen Stämmen nach Anaerob-Anzucht auftretende und experimentell gut abgesicherte streng exponentielle Kurvenverlauf der Dosis-Effekt-Kurven für die farbstoffsensibilisierte Inaktivierung. Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch sowohl für die Stämme mit Resistenzgewinn, als auch für die Stämme, die aufgrund der anaeroben Anzuchtbedingungen einen Resistenzverlust gegenüber photodynamischer Sensibilisierung erfahren.

Tabelle 5: Dosis-Modifikationsfaktoren nach anaerober und aerober Anzucht der Stämme

Deckung des Energiebedarfs während der Anzucht	235-11 c	2105-15	2121-140	211-1 aM
anaerob (VM)	2,57	0,70	1,50	0,26
aerob (Gly)	33,50	3,50	15,00	4,00

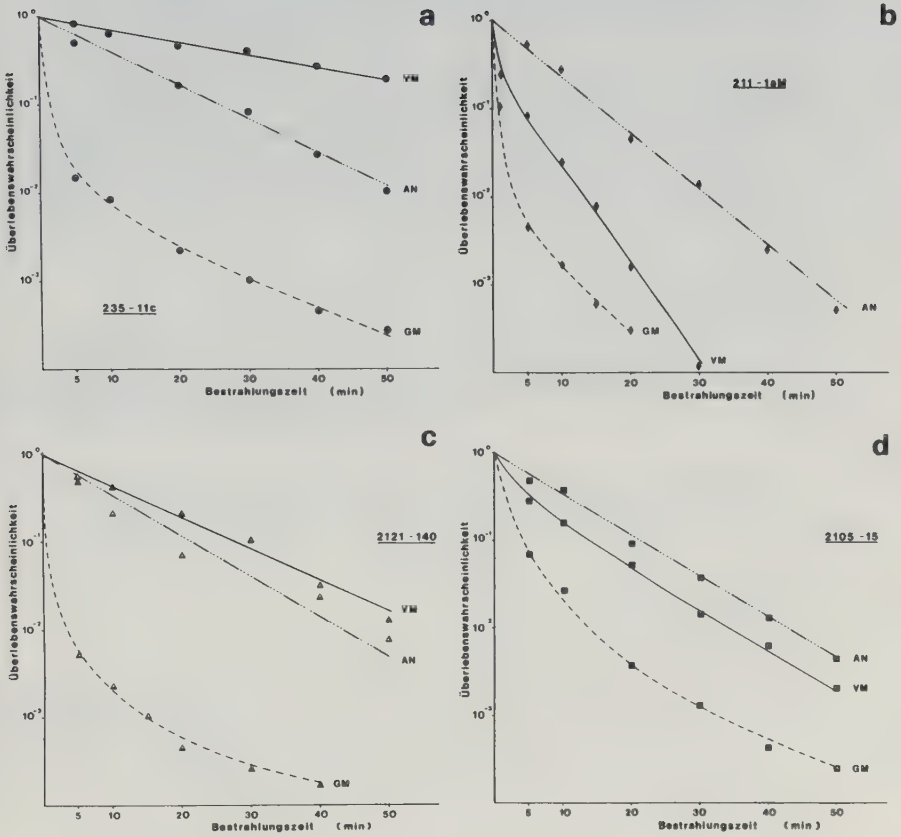


Abb. 7.: Dosis-Effekt-Kurven für die photodynamische Sensibilität der Stämme 235-11 c (a), 211-1 aM (b), 2121-140 (c) und 2105-15 (d) nach Anzucht unter Standard-Vorkulturbedingungen (VM), nach Anzucht auf Vollmedium im sauerstoff-freien Milieu einer Anaerob-Box (AN) und nach Anzucht auf Glycerin-Medium.

Demgegenüber führt die Anzucht auf nicht fermentierbaren Glycerinmedium bei allen Stämmen zu erheblichen Resistenzverlusten, wie auch aus den Werten der Tabelle 5 ersichtlich ist. Besonders die Stämme 235-11 c und 2121-140, die unter Standard-Vorkulturbedingungen eine geringe (235-11 c) bzw. mittlere (2121-140) Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung aufweisen, werden nach Anzucht auf Glycerinmedium hochsensibel. Aus dem Verlauf der Glycerin-Anzucht bezogenen Dosis-Effekt-Kurven ist zu ersehen, daß die photodynamische Sensibilisierung am effektivsten im niedrigen Dosisbereich (bis 10 min Bestrahlung) wirkt, während die farbstoffsensibilisierte Abtötung der Zellen im höheren Dosisbereich wieder geringer wird. Dadurch zeigen alle Kurven in ihrem Verlauf eine auffallende Schwänzung.

Da Knospen oder Doppelzellen in der Versuchssuspension besonders bei höheren Bestrahlungsdosen sensibilitätsreduzierend wirken können, ist es denkbar, daß die im höheren Dosisbereich auftretende Schwänzung der Kurven mit dem in der Zellsuspension auftretenden Anteil an Knospen in Beziehung steht. Diese Annahme erscheint jedoch aus folgenden Gründen nicht zutreffend:

- Zwar ist der Knospenanteil der Zellen nach Glycerin-Anzucht 5 % - 10 % im Durchschnitt höher gelegen als nach Anzucht auf Standard-Vorkulturmedium, aber photodynamische Inaktivierungsversuche mit Zellsuspensionen von normal kultivierten Stämmen, die einen prozentual höheren Anteil knospender Zellen aufwiesen, erbrachten keinen ähnlichen Dosis-Effekt-Kurvenverlauf, sondern bestätigten die Standard-DEK.

- Keine der Vorkultur-abhängigen DEK der vorhergehenden Versuche zeigt einen vergleichbaren Kurvenverlauf, obwohl auch nach Anzucht auf Vorkulturmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen oder Kohlehydrat-

quellen der Anteil an Knospen und Doppelzellen bei den einzelnen Stämmen stark schwankt und ebenfalls bis zu 10 % betragen kann.

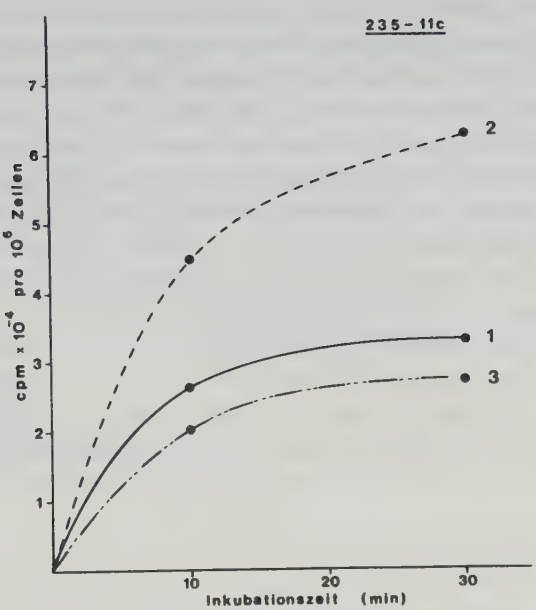
Die Schwänzung des Kurvenverlaufs nach Anzucht auf Glycerinmedium ist offensichtlich ein ebenso charakteristisches Merkmal der farbstoffsensibilisierten Zellinaktivierung wie der streng exponentielle Kurvenverlauf nach Anaerob-Anzucht.

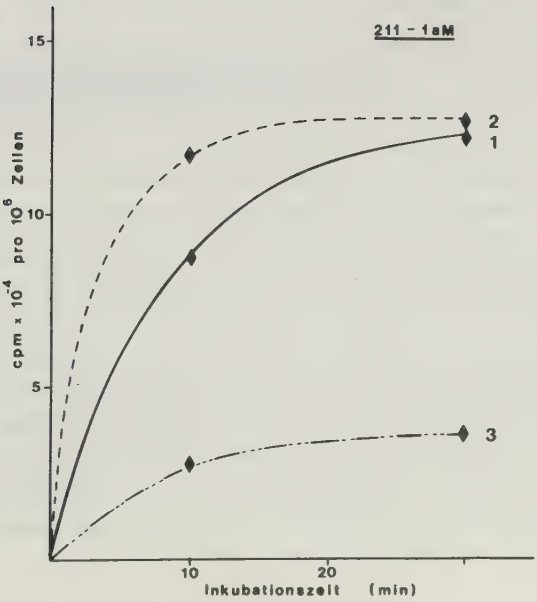
Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die durch äußere Bedingungen zur Atmung bzw. zur Gärung gezwungenen Zellen sehr unterschiedlich auf gleichartige photodynamische Behandlung mit TP reagieren.

3.2.6. Aufnahme von TP-H^3 in Abhängigkeit von aeroben und anaeroben Vorkulturbedingungen

Der beachtliche Sensibilitätsunterschied gegenüber photodynamischer Behandlung bei aerob bzw. anaerob angezogenen genetisch gleichen Stämmen ließe sich einerseits durch eine unterschiedliche Sensibilität der mit dem Atmungs- und Gärungsstoffwechsel in Beziehung stehenden Zellkomponenten erklären. Andererseits könnten die durch aerobe bzw. anaerobe Vorkulturbedingungen induzierten cytoplasmatischen Unterschiede auf die farbstoffsensibilisierte Photooxidation begünstigend oder hemmend wirken. Da Thiopyronin durch seine Bindung an Zellbestandteile über das Diffusionsgleichgewicht hinaus in der Zelle stark angereichert wird (MICHELER, 1972), sollte eine intrazelluläre Variation der Farbstoffkonzentration, hervorgerufen durch eine unterschiedliche Anzahl an bindungskompetenten Zellorganellen wie sie die Mitochondrien und Ribosomen darstellen (MICHELER, 1972; STEVENS, 1974, 1977), die photodynamische Inaktivierungsrate beeinflussen.

Abb. 8 und 9.: Einfluß der Vorkultur auf die zelluläre Aufnahme- und Bindungsfähigkeit der Stämme 235-11 c und 211-1 aM von radioaktiv markiertem TP-H^3 nach Anzucht auf Vollmedium (1), nach Anzucht auf Glycerinmedium (2) und nach Anzucht auf VM unter anaeroben Bedingungen (3).


235 - 11c
cpm x 10⁻⁴ pro 10⁶ Zellen
7
6
5
4
3
2
1
10
20
30
Inkubationszeit (min)
2
1
3


211 - 1aM
cpm x 10⁻⁴ pro 10⁶ Zellen
15
10
5
10
20
Inkubationszeit (min)
2
1
3

Informationen über die umweltabhängige Farbstoffaufnahme der Zellen gewinnt man mit Hilfe von radioaktiv markierten TP-H^3. Abbildungen 8 und 9 zeigen die TP-H^3 Aufnahmekinetiken der Stämme 235-11 c und 211-1 aM in Abhängigkeit von ihrer Anzucht auf Vollmedium (Kurve 1), auf Glycerinmedium (Kurve 2) und unter Sauerstoffentzug (Kurve 3). Unabhängig von den Vorkulturbedingungen nimmt die TP-Konzentration mit der Dauer der Inkubationszeit bei beiden Stämmen zu. Die Aufnahmegeschwindigkeit dagegen ist abhängig von den jeweils erfolgten Vorkulturbedingungen. Sie ist am größten nach Glycerinmedium-Anzucht und am kleinsten nach anaerober Anzucht. Das bedeutet, daß die unter bestimmten Vorkulturbedingungen aufgewachsenen Zellen bei gleich langer Inkubationszeit in TP-Lösung der Konzentration 10 µg/ml unterschiedliche Mengen an Farbstoff aufnehmen.

Bezieht man die aufgenommenen Mengen auf die unter Standard-Vorkulturbedingungen erhaltenen Konzentrationswerte, so ergeben sich für die Anzucht unter abgeänderten Vorkulturbedingungen folgende prozentuale Mengenverhältnisse:

Anzucht	Farbstoffaufnahme 235-11 c	211-1 aM
VM	100 %	100 %
GM	173 %	102 %
AN	77 %	29 %

Die TP-Aufnahmekurven weisen sowohl bestimmte Übereinstimmungen als auch gewisse Unterschiede zu den Inaktivierungskurven auf. Eindeutig scheinen der Zusammenhang zwischen stark erhöhter Farbstoffaufnahme und Sensibilitätserhöhung bei Stamm 235-11 c nach Glycerinmedium-Anzucht und der Zusammenhang zwischen reduzierter Farbstoffaufnahme und Resistenzgewinn nach anaerober Anzucht bei Stamm 211-1 aM. Auch der geringe Sensibilitätszuwachs bei Stamm 211-1 aM nach Glycerinmedium-Anzucht

scheint seine Ursache in der nur wenig erhöhten Farbstoffaufnahme zu haben. Demgegenüber bewirkt die durch Anaerob-Anzucht des Stammes 235-11 c reduzierte Farbstoffaufnahme bei diesem keinen Resistenzgewinn gegenüber dem PDE. Das deutet darauf hin, daß bei der umweltabhängigen farbstoffsensibilisierten Inaktivierung gleichzeitig genetische Faktoren ihre Wirkung entfalten bzw. mit den Umweltfaktoren in Wechselwirkung treten.

3.3. Einfluß cytoplasmatischer Bestandteile auf die photodynamische Sensibilität der Stämme

3.3.1. Problemstellung

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Mitochondrien bzw. mitochondrialen Bestandteile einen vom Farbstoff bevorzugten Bindungsort darstellen und damit gleichzeitig auch Hauptangriffsort des PDE sein könnten. Das würde die Meinung der Autoren bestätigen, die aufgrund ihrer Untersuchungen vermuten, daß Thiopyronin durch die photodynamische Schädigung cytoplasmatischer Bestandteile einer eukaryotischen Zelle inaktivierend wirkt und nicht über eine Schädigung der DNS.

Das Mitochondrium, eine cytoplasmatisch vererbbare Zellorganelle, besitzt eine gewisse Autonomie innerhalb der Zelle, ist jedoch in vielen Funktionen abhängig vom Zellkern (Übersichtsarbeiten: MAHLER, 1973; WILLIAMSON et al., 1977; GRIVELL, 1983).

Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle ist nicht nur abhängig von den Umweltbedingungen und der Wachstumsphase, sondern auch vom untersuchten Hefestamm (BLEEG et al., 1972; GOLDTHWAITE et al., 1974; STEVENS, 1977).

Um die Beteiligung mitochondrialer Bestandteile an der durch Farbstoff sensibilisierten Inaktivierung zu überprüfen, bietet sich eine vergleichende Untersuchung von atmungskompetenten und atmungsdefizienten rho^--Stämmen an. Denn während in den vorhergehenden Versuchen der aerobe Atmungsstoffwechsel durch äußere Bedingungen aktiviert oder inaktiviert werden konnte, ohne jedoch die Funktionsfähigkeit der Organellen zu zerstören, beruht die Atmungsdefizienz von rho^--Stämmen auf einer nuclearen (SHERMAN, 1963; SHERMAN and SLONIMSKI, 1964) oder weitaus häufiger auf einer cytoplasmatischen Mutation, die immer zu funktionslosen Mitochondrien führt.

Die von EPHRUSSI (1955) beschriebene irreversible cytoplasmatische rho^--Mutation beruht auf dem teilweisen oder vollständigen Verlust der mitochondrialen DNS (CARNEVALI et al., 1969; NAGLEY and LINNANE, 1970) und hat infolge der Deletion verschiedener genetischer Marker bei gleichzeitiger Vermehrung der A-T-haltigen Sequenzen den Verlust der membrangebundenen Cytochrome a und b zur Folge (MEHROTRA and MAHLER, 1968; FAYE et al., 1973).

Phänotypisch zeigen Atmungsdefiziente eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit und eine kleinere Koloniegröße als der Wildtyp.

Bewiesen ist, daß viele mitochondriale rho^--Mutanten eine vom rho^+-Stamm abweichende Sensibilität gegenüber inaktivierenden Substanzen aufweisen (PARRY and PARRY, 1969; WATERS and MOUSTACCHI, 1975; CHANET et al., 1976; DEVIN and KOLTOVAYA, 1981; KOLTOVAYA and DEVIN, 1982), was darauf hindeutet, daß dem mitochondrialen Genom eine gewisse Beteiligung an der Kontrolle der Agenz-abhängigen Zellsensibilisierung zukommt. Der Einfluß mitochondrialer Bestandteile auf die photodynamische Inaktivierungsrate könnte sich ebenfalls in einem unterschiedlichen Sensibilitätsverhalten von rho^+- und rho^--Stämmen gegenüber dem PDE äußern. Denkbar wäre:

a) Die Herabsetzung der photodynamischen Inaktivierungsrate bei Atmungsdefizienten gegenüber dem Wildtyp durch die Bindung der Farbstoffmoleküle an die durch die cytoplasmatische rho$^-$-Mutation funktionslos gewordenen Mitochondrien oder

b) eine Erhöhung der photodynamischen Inaktivierungsrate bei Atmungsdefizienten, verursacht durch einen Mangel an bindungskompetenten mitochondrialen Bestandteilen wie sie die innere Membran, die membrangebundenen und löslichen Atmungsenzyme oder die guaninreichen mitochondrialen DNA-Sequenzen darstellen könnten. Als mögliche Folge könnte sich der Farbstoff vermehrt an andere lebenswichtige Zellbestandteile der atmungsdefizienten Zelle binden, was zu einer Erhöhung ihrer photodynamischen Sensibilität führen würde.

Ein zusätzlicher Beweis für die Bindung der TP-Farbstoffmoleküle an die cytoplasmatischen Mitochondrien wäre die Induktion cytoplasmatischer rho$^-$-Mutationen bei photodynamisch behandelten atmungskompetenten rho$^+$-Stämmen.

3.3.2. Sensibilitätsvergleich bei rho$^+$- und rho$^-$-Stämmen nach photodynamischer Behandlung

Die Isolierung der rho$^-$-Stämme erfolgte durch Abimpfung spontan entstandener und induzierter Atmungsdefekter von den VM-Platten unbehandelter und photodynamisch behandelter atmungskompetenter rho$^+$-Stämme. Im Gegensatz zu den Atmungsdefizienten des Stammes 211-1 aM sind atmungsdefekte Zellen der Stämme 235-11 c, 2105-15 und 2121-140, die trotz Adeninbedürftigkeit keinen roten Farbstoff bilden, als kleine weiße Kolonien von den größeren rot gefärbten atmungskompetenten Kolonien leicht zu unterscheiden. Alle isolierten rho$^-$-Mutanten wurden durch Plattieren auf GM nochmals auf tatsächliche vorhandene Atmungsdefizienz getestet. Es wurden die folgenden in Tabelle 6 aufgeführten rho$^-$-Stämme isoliert:

Tabelle 6: Übersicht der atmungsdefekten Stämme

Typ	Stamm 235-11 c	Stamm 211-1 aM	Stamm 2121-140	Stamm 2105-15
spontane Atmungsdefekte	rho^-_{s-1} rho^-_{s-2}	rho^-_{s-3} rho^-_{s-4} rho^-_{s-5}	rho^-_{s-6} rho^-_{s-7} rho^-_{s-8}	rho^-_{s-9} rho^-_{s-10}
induzierte Atmungsdefekte	rho^-_{i-5} rho^-_{i-30} rho^-_{i-60}	rho^-_{i-1} rho^-_{i-10} rho^-_{i-20}	rho^-_{i-10} rho^-_{i-50}	rho^-_{i-10} rho^-_{i-30} rho^-_{i-50}

Die Abbildungen 10 bis 13 zeigen die DEK für das Koloniebildungsvermögen der spontan entstandenen rho^--Stämme sowie der entsprechenden atmungskompetenten Stämme nach photodynamischer Behandlung mit TP. Die einzelnen Kurvenwerte wurden aus 3 - 4 Versuchen des bezeichneten rho^--Stammes gemittelt. Aufgrund des uneinheitlichen Mutationsgeschehens durch den Verlust unterschiedlicher mitochondrialer genetischer Marker (HEUDE et al., 1979), können verschiedene Atmungsdefekte eine unterschiedliche genetische Konstitution haben. Darum wurde zunächst nur ein vom jeweiligen atmungskompetenten rho^+-Stamm isolierter rho^--Stamm untersucht. Mit dem Einfluß möglicher cytogenetischer Unterschiede auf das Sensibilitätsverhalten nach photodynamischer Behandlung befaßt sich das nachfolgende Kapitel.

Die Graphiken zeigen als Beweis für den Einfluß cytoplasmatischer Bestandteile auf die Überlebensrate nach photodynamischer Behandlung das von den rho^+-Stämmen abweichende Sensibilitätsverhalten der vier untersuchten atmungsdefekten Stämme gegenüber dem PDE. Es zeigt sich gleichzeitig, daß Atmungsdefizienz in unterschiedlicher Weise das Überleben der Stämme beeinflussen kann. So bewirkt die cytoplasmatische

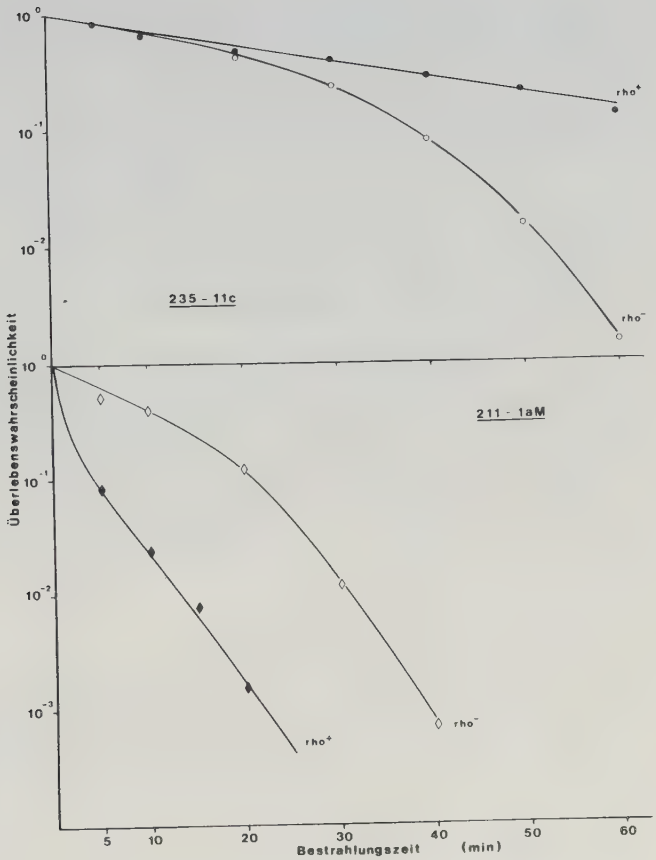


Abb. 10 und 11.: Dosis-Effekt-Kurven der atmungskompetenten Elternstämme 235-11 c rho $^{+}$ und 211-1 aM rho^{+} sowie der spontan entstandenen atmungsdefekten Mutanten 235-11 c rho^{-} und 211-1 aM rho^{-} nach photodynamischer Behandlung

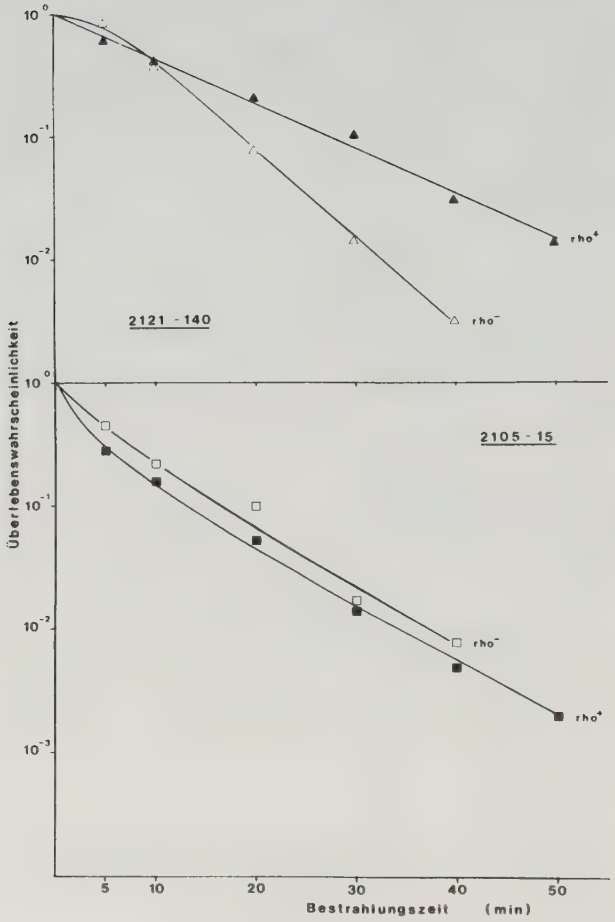


Abb. 12 und 13.: DEK der atmungskompetenten Elternstämme 2121-140 rho^+ und 2105-15 rho^+ sowie der spontan entstandenen atmungsdefekten Mutanten 2121-140 rho^- und 2105-15 rho^-.

Mutation zur Atmungsdefizienz bei den Stämmen 235-11 c und 2121-140 eine Sensibilitätserhöhung gegenüber photodynamischer Behandlung, während sie bei Stamm 211-1 aM einen deutlichen Resistenzgewinn hervorruft. Ein mit dem Atmungsdefekt korrelierter geringer Resistenzzuwachs kann auch bei Stamm 2105-15 verzeichnet werden.

Die DEK der atmungsdefizienten Mutanten weisen bei drei der untersuchten Stämme einen Schulterbereich auf, der in einen exponentiellen Abfall übergeht, und zwar bei den Stämmen 235-11 c rho^-_{s-1} und 211-1 aM rho^-_{s-3} ab 4 % Überlebensrate und bei Stamm 2121-140 rho^-_{s-6} ab 40 % Überlebensrate. Hierin unterscheiden sie sich gleichzeitig von den rho^+-Stämmen, deren DEK für die Sensibilität des Koloniebildungsvermögens nach photodynamischer Behandlung keine Schultern aufweisen, sondern eher einen Bauch im niederen Dosisbereich. Als einziger zeigt Stamm 2105-15 rho^-_{s-9} keine Schulter, sondern einen exponentiellen Kurvenverlauf.

Die Schulter in den DEK der Atmungsdefizienz-Stämme tritt sowohl bei den Stämmen auf, bei denen Atmungsdefizienz zu einer Erhöhung der photodynamischen Sensibilität führt, als auch bei Stamm 211-1 aM rho^-_{s-3}, der als Folge seines Atmungsdefekts einen beachtlichen Resistenzgewinn nach photodynamischer Behandlung erfährt. Hier liegt offensichtlich eine Korrelation zwischen Schulterbildung und cytoplasmatischer rho^--Mutation vor, die unabhängig ist vom nachfolgenden Inaktivierungsgeschehen.

3.3.3. Untersuchungen zum Einfluß spontaner und induzierter Atmungsdefizienz auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit der Stämme

Aufgrund des unterschiedlichen Mutationsgeschehens bei cytoplasmatischen rho^--Mutanten könnte die Farbstoff-Substrat-

Bindung durch die unterschiedliche cytogenetische Konstitution beeinflußt werden. In diesem Fall wäre die Ausbildung des Schulterbereichs, der ja bei Stamm 2105-15 rho^-_{s-9} vollkommen fehlt sowie die durch Atmungsdefizienz induzierte Zu- oder Abnahme der photodynamischen Sensibilität eines Stammes lediglich eine Folge der vorliegenden cytoplasmatischen Mutation des untersuchten Stammes und könnte bei einem anderen Atmungsdefizienten des gleichen Stammes anders verlaufen. Es ist daher wichtig zu prüfen, ob verschiedene Atmungsdefekte des gleichen Stammes gleiches oder unterschiedliches Verhalten gegenüber photodynamischer Behandlung zeigen.

Bei photodynamischer Behandlung mit TP wird in hohem Maße Atmungsdefizienz induziert (ROTH et al., 1978), wobei sich die so entstandenen rho^--Stämme als wesentlich sensibler erweisen sollen als der rho^+-Stamm (WATANABE, 1976). Aus diesem Grund wurden mehrere spontan entstandene Atmungsdefekte sowie durch photodynamische Behandlung induzierte Atmungsdefekte eines Stammes isoliert und auf ihre photodynamische Sensibilität geprüft.

Die induzierten rho^--Mutanten wurden von VM-Platten mit Farbstoff behandelten und unterschiedlich bestrahlten Proben abgeimpft. Der Index i-x gibt die Dauer der Bestrahlungszeit in min an, der die Probe ausgesetzt war.

In den Abbildungen 14 bis 17 können die DEK nach photodynamischer Behandlung der verschiedenen isolierten rho^--Stämme miteinander verglichen werden. Aus den Graphiken geht hervor:

- Spontane und induzierte Atmungsdefekte des Stammes 235-11 c zeigen im Rahmen der statistischen Schwankungsbreite gleiche Sensibilität gegenüber dem PDE (Abb. 14). Die DEK der verschiedenen rho^--Stämme entsprechen in ihrem Verlauf der DEK des Stammes 235-11 c rho^-_{s-1}, d.h. alle Stämme zeigen eine ausgeprägte Schulter über einen weiten Dosisbereich,

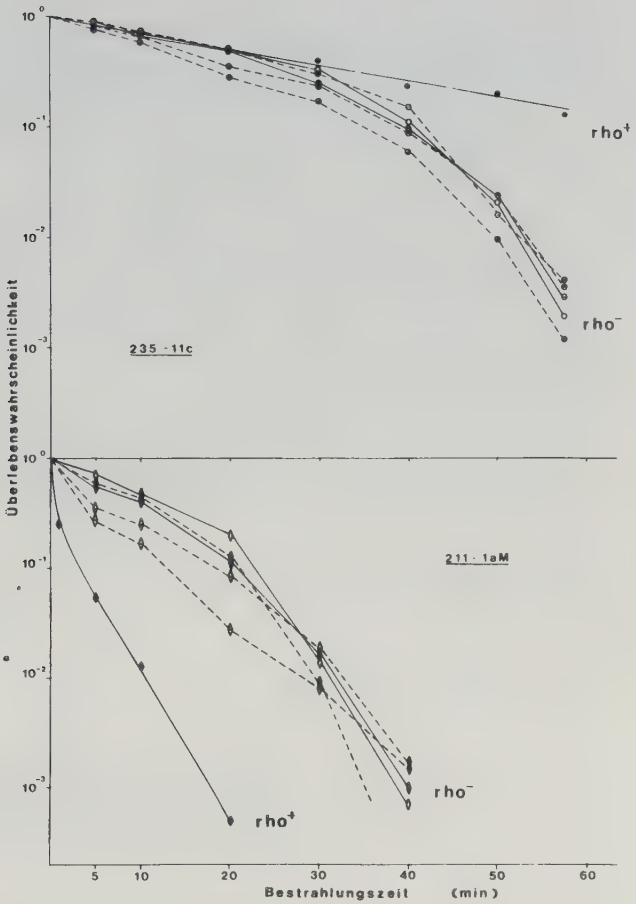


Abb. 14 und 15.: DEK nach photodynamischer Behandlung der atmungskompetenten rho$^+$-Elternstämme sowie verschiedener spontan entstandener und TP-induzierter atmungsdefekter rho$^-$-Mutanten mit Thiopyronin als Sensibilisator. Es bezeichnen geschlossene Symbole und durchgezogene Linie die rho$^+$-Elternstämme; offene Symbole und durchgezogene Linie die spontan entstandenen atmungsdefekten rho^-_s-Mutanten und offene Symbole und gestrichelte Linie die TP-induzierten atmungsdefekten rho^-_i-Mutanten.

die in einen exponentiellen Abfall übergeht. Atmungsdefizienz führt bei allen cytoplasmatischen Mutanten dieses Stammes zu einer Sensibilitätserhöhung, besonders nach Applizierung hoher Strahlendosen, gegen die der Wildtyp relativ unempfindlich ist.

- Alle isolierten und photodynamisch behandelten spontanen und induzierten rho^--Mutanten des Stammes 211-1 aM besitzen einen beachtlichen Überlebensvorteil gegenüber dem atmungskompetenten Wildtyp. Beim Vergleich der einzelnen Überlebenskurven (Abb. 15) zeigt sich jedoch, daß die rho^--Stämme besonders im niederen bis mittleren Dosisbereich (0 - 20 min Bestrahlung) Sensibilitätsschwankungen aufweisen, die zu einer unterschiedlichen Schulterbildung führen, und zwar von einer gut ausgeprägten Schulter bei Stamm 211-1 aM rho^-_{s-3} bis zum vollständigen Fehlen des gesamten Schulterbereichs bei Stamm 211-1 aM rho^-_{i-10}.

  Es ist nicht eindeutig festzustellen, ob das Fehlen oder Vorhandensein einer Schulter nach photodynamischer Behandlung unabhängig vom Status des jeweiligen rho^--Stammes ist, d.h. ob spontane und induzierte Atmungsdefekte in jedem Fall den gleichen Sensibilitätsschwankungen unterworfen sind. Bei den hier untersuchten Stämmen zeigen zwei von drei photodynamisch behandelten induzierten rho^--Stämmen keine Schulterbildung, wohingegen die drei spontan entstandenen Atmungsdefiziente immer eine mehr oder minder ausgeprägte Schulter aufweisen. Die exponentiellen Kurventeile der rho^--DEK zeigen in etwa die gleiche Steigung wie der atmungskompetente Elternstamm.

- Die bei Stamm 2121-140 TP-induzierte oder spontan auftretende cytoplasmatische rho^--Mutation ist immer korreliert mit einer allgemeinen Sensibilitätszunahme gegenüber dem PDE. Gleichzeitig zeigen jedoch spontane und induzierte Atmungsdefekte deutliche Sensibilitätsunterschiede über den gesamten Dosisbereich (Abb. 16).

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen sind spontan entstandene rho$^-$-Stämme dieses Stammes weniger sensibel als photodynamisch induzierte. So besitzen die Stämme 2121-140 rho$^-_{s-6}$ und rho$^-_{s-7}$ im niederen Dosisbereich (0 - 15 min Bestrahlung) etwa die gleiche Empfindlichkeit wie der rho$^+$-Stamm. Erst ab 20 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht nehmen die atmungsdefekten Zellen an Sensibilität zu. Eine Schulter die ab 40 % Überlebende in einen exponentiellen Abfall übergeht ist charakteristisch für die DEK der spontanen rho$^-$-Stämme 2121-140 rho$^-_{s-6}$ und rho$^-_{s-7}$. Die DEK der TP-induzierten rho$^-$-Stämme 2121-140 rho$^-_{i-10}$ und rho$^-_{i-50}$ besitzen keine Schulter (höchstens andeutungsweise Stamm rho$^-_{i-50}$), sondern weisen - wie der rho$^+$-Stamm 2121-140 - einen exponentiellen Kurvenverlauf auf.

- Die deutlichsten Unterschiede zeigt Stamm 2105-15 (Abb. 17). Während spontan entstandene Atmungsdefekte etwas resistenter gegenüber photodynamischer Behandlung sind als der rho$^+$-Stamm, sind alle TP-induzierten rho$^-$-Stämme deutlich sensibler.

  Eine Schulterbildung ist nicht zu beobachten. Der für Stamm 2105-15 rho$^+$ im niederen Dosisbereich (0 - 10 min Bestrahlung) charakteristische "Bauch" geht bei spontan entstandenen Atmungsdefizienten verloren. Die Überlebenskurven photodynamisch behandelter spontaner rho$^-$-Mutanten dieses Stammes folgen einem exponentiellen Verlauf. Die DEK der wesentlich empfindlicheren induzierten Atmungsdefekte 2105-15 rho$^-_{i-10}$ und rho$^-_{i-50}$ sind ebenfalls durch das Auftreten eines "Bauchs" gekennzeichnet, der ab 110 % Überlebensrate in den exponentiellen Kurventeil übergeht. Ein von den isolierten rho$^-$-Stämmen abweichendes Sensibilitätsverhalten zeigt Stamm 2105-15 rho$^-_{i-30}$, dessen Überlebenskurve nach photodynamischer Behandlung weder einen Schulterbereich noch einen exponentiellen Abfall zeigt, sondern schon bei geringer Abtötung eine deutliche Schwänzung.

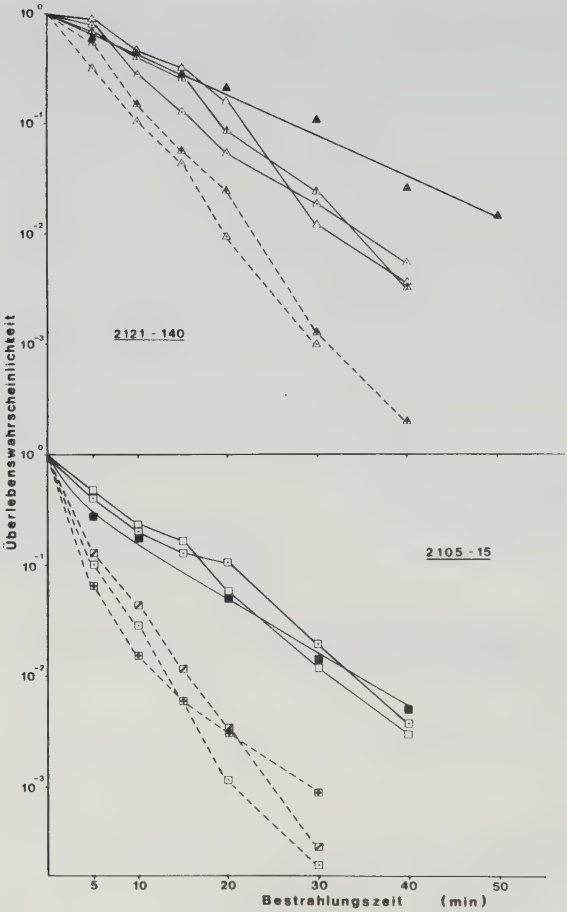


Abb. 16 und 17.: DEK nach photodynamischer Behandlung der atmungskompetenten rho$^+$-Elternstämme sowie verschiedener spontan entstandener und TP-induzierter atmungsdefekter rho$^-$-Mutanten mit Thiopyronin als Sensibilisator. Es bezeichnen geschlossene Symbole und durchgezogene Linie die rho$^+$-Elternstämme; offene Symbole und durchgezogene Linie die spontan entstandenen atmungsdefekten rho^-_s-Mutanten und offene Symbole und gestrichelte Linie die TP-induzierten atmungsdefekten rho$^-$-Mutanten.

Eine Übersicht über die photodynamische Sensibilität der isolierten rho^--Stämme gibt Tabelle 7, in der die DRF der LD_{10} eines jeden Stammes eingetragen sind.

Tabelle 7: Dosis-Reduktions-Faktoren der isolierten spontanen und photodynamisch induzierten Atmungsdefekte bei 10 % Überlebende (LD_{10})

S t a m m		spontane Atmungsdefekte			induzierte Atmungsdefekte		
235-11 c		rho^-_{s-1}	rho^-_{s-2}		rho^-_{i-30}	rho^-_{i-60}	rho^-_{i-5}
	DRF	1,71	1,63		1,59	1,71	1,90
2121-140		rho^-_{s-6}	rho^-_{s-7}	rho^-_{s-8}	rho^-_{i-10}	rho^-_{i-50}	
	DRF	1,24	1,38	1,61	2,57	2,25	
2105-15		rho^-_{s-9}	rho^-_{s-10}		rho^-_{i-10}	rho^-_{i-30}	rho^-_{i-50}
	DRF	0,89	0,95		3,0	4,0	2,4
211-1 aM		rho^-_{s-3}	rho^-_{s-4}	rho^-_{s-5}	rho^-_{i-1}	rho^-_{i-10}	rho^-_{i-20}
	DRF	0,13	0,14	0,14	0,17	0,23	0,14

Die Versuche haben gezeigt, daß es Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem PDE bei verschiedenen Atmungsdefekten eines Stammes geben kann, aber nicht immer geben muß.

Zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten Sensibilitätsunterschiede bei spontan entstandenen und photodynamisch induzierten cytoplasmatischen rho^--Mutanten der Stämme 2121-140 und 2105-15. In beiden Fällen wiesen die induzierten rho^--Stämme eine eindeutig höhere Sensibilität auf als die spontanen Mutanten, wobei die photodynamisch behandelten rho^--Stämme vom Stamm 2105-15 das auffallendste Sensibilitätsverhalten zeigten: Zum einen einen Resistenzgewinn der spontanen Atmungsdefekten gegenüber dem rho^+-Stamm, zum anderen eine Sensibilitätserhöhung der TP-induzierten Atmungsdefekten gegenüber dem Wildtyp.

Das uneinheitliche cytoplasmatische Mutationsgeschehen, das phänotypisch zur Atmungsdefizienz führt, ist offensichtlich nicht ohne Einfluß auf die photodynamische Inaktivierungsrate. Allerdings scheint dieses Verhalten stammspezifisch, da es nur für die Stämme 2121-140 und 2105-15 nachgewiesen werden konnte. Das ist denkbar, da Bau und zum großen Teil auch Funktion der Mitochondrien vom Zellkern gesteuert werden und infolgedessen dem nuklearen Genom ein wesentlicher Einfluß auf die spontane und induzierte Mutationsauslösung zukommt (MOUSTACCHI, 1972, 1973; ECKARDT, 1974; LUSENA and JAMES, 1976; MARMIROLI et al., 1980).

3.3.4. Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutanten nach photodynamischer Behandlung

Nachdem sich aufgrund der bisherigen Versuche ein Einfluß mitochondrialer Bestandteile auf die stammspezifische photodynamische Inaktivierungsrate bestätigen ließ und damit das cytoplasmatische Mitochondrium als ein Target des PDE eingeordnet werden kann, stellt sich nun die Frage nach dem mitochondrialen Bindungsort der Farbstoffmoleküle. Denkbar wäre eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs über das gesamte Mitochondrium wie äußere und innere Membran, Intercristaeraum, Matrix, mitochondriale DNA oder aber eine Konzentrierung des Farbstoffs auf einen dieser Bereiche.

Um genaue Informationen über die tatsächliche Verteilung der Farbstoffmoleküle am und im Mitochondrium zu erhalten, müßten differenzierte biochemische Methoden eingesetzt werden. Das war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich. Um dem Problem trotzdem nahe zu kommen, wurde auf eine in der Mikrobiologie bewährte Untersuchungsmethode zurückgegriffen: Die Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutationen, die in der Hefegenetik als indirekter Beweis für die Schädigung der mitochondrialen DNA durch ein bestimmtes Agenz gilt.

Ist das mitochondriale Genom ein Wirkort des PDE, was durch eine Begünstigung der Farbstoff-Substrat-Bindung aufgrund guaninreicher mitochondrialer DNA-Sequenzen denkbar erscheint, so müßte die rho$^-$-Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung der Stämme über dem Anteil an spontanen Atmungsdefizienten liegen. Bei gleicher Behandlung der Stämme sollte die Effektivität der Mutationsauslösung von der Menge der an die mitochondriale DNA gebundenen Farbstoffmoleküle abhängen.

Im Unterschied zu den Inaktivierungsexperimenten wurde bei den Versuchen zur photodynamischen rho$^-$-Induktion mit einer 10-fach geringeren Farbstoffkonzentration(1 µg TP/ml Lösung) gearbeitet. So konnte die photodynamische Inaktivierungsrate während der rho$^-$-Induktion stark reduziert und die Mutationskinetik besser verfolgt werden. Die Berechnung der induzierten Rate atmungsdefekter Mutanten basiert auf der in Kapitel 2.7.2. angegebenen Formel. Der Anteil spontan vorhandener rho$^-$-Mutanten liegt bei den Stämmen 235-11 c bei 35 %, bei 211-1 aM bei 10 %, bei 2121-140 bei 30 % und bei 2105-15 bei 22 %.

Abbildung 18 zeigt die Induktion cytoplasmatischer rho$^-$-Mutationen der vier untersuchten Stämme durch TP und Licht als Funktion der Bestrahlungszeit. Aus der Graphik ist zu ersehen, daß Thiopyronin ein potentielles Mutagen in der cytoplasmatischen Mutationsauslösung darstellt. In den TP-inkubierten atmungskompetenten Stämmen werden bei anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit in zunehmendem Maße rho$^-$-Mutationen zur Atmungsdefizienz induziert. Die Stämme zeigen eine parabelartige Dosisabhängigkeit bei der Induktion atmungsdefekter Mutanten. Das bedeutet, daß die Zunahme an Atmungsdefizienten/Dosiseinheit (Bestrahlungszeiteinheit) bei allen Stämmen zu Beginn der Bestrahlung (0 - 10 min) am größten ist und ab etwa 15 min Bestrahlung geringer wird bzw. eine Sättigung erreicht. Die Induktionsgeschwindigkeit ist am größten bei Stamm 211-1 aM, gefolgt von den Stämmen 235-11 c, 2105-15 und 2121-140. Nach 15 min Bestrahlung weist Stamm 211-1 aM 81 % induzierte Atmungsdefekte

auf, gegenüber 64 % bei Stamm 235-11 c, 43 % bei Stamm 2105-15 und 35 % bei Stamm 2121-140. Das entspricht einem Verhältnis an induzierten rho$^-$-Mutationen von 1 : 0,8: 0,5: 0,4. Es wird bei gleicher photodynamischer Behandlung (gleiche TP-Konzentration, gleiche Einwirkzeit, gleiche Bestrahlungszeit) eine unterschiedliche Anzahl cytoplasmatischer Mutanten in den einzelnen Stämmen induziert.

Da sich die Saccharomyces-Stämme in ihrer Sensibilität gegenüber dem PDE unterscheiden, ist eine graphische Auftragung der Atmungsdefizienz-Induktion als Funktion der Überlebensrate zur besseren Interpretation des TP-induzierten cytoplasmatischen Mutationsgeschehens sinnvoll (Abb. 19).

Unter diesen Bedingungen weisen die Stämme 235-11 c und 2121-140 eine größere Sensibilität gegenüber photodynamischer rho$^-$-Induktion auf als die anderen beiden Stämme. Aus der Graphik wird deutlich, daß die cytoplasmatische rho$^-$-Induktion der Stämme 235-11 c und 2121-140 über einen weiten Dosisbereich unabhängig von der Überlebensrate erfolgt, die nur wenig reduziert wird (Abb. 20). Bei einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 50 % weisen die Stämme je 95 % (235-11 c) und 75 % (2121-140) induzierte rho$^-$-Mutationen auf. Das würde bedeuten, daß der photodynamische Schaden an der mitochondrialen DNA, der zur Entstehung des Atmungsdefekts führt, bereits vor einer signifikanten photodynamischen Inaktivierung des gesamten Zellsystems gesetzt wird. Gleichzeitig hieße das, daß die photodynamische Inaktivierung der Zellen in definierter Reihenfolge abliefe, wonach die Setzung eines für die Zelle letalen Schadens - insbesondere bei Stamm 235-11 c - erst nach einer weitgehenden Inaktivierung des cytoplasmatischen Atmungsapparates aufgrund einer Schädigung des mitochondrialen Genoms erfolgen würde.

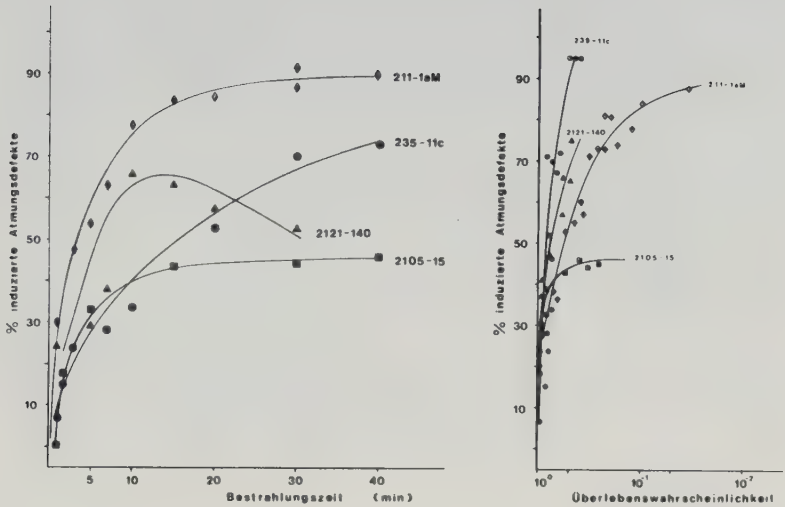


Abb. 18.: Induktion atmungsdefizienter rho$^-$-Mutanten durch photodynamische Behandlung mit Thiopyronin (1 µg/ml, 30 min DW) in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.

Abb. 19.: Abhängigkeit der photodynamisch induzierten atmungsdefekten rho$^-$-Mutanten von der Überlebensrate.

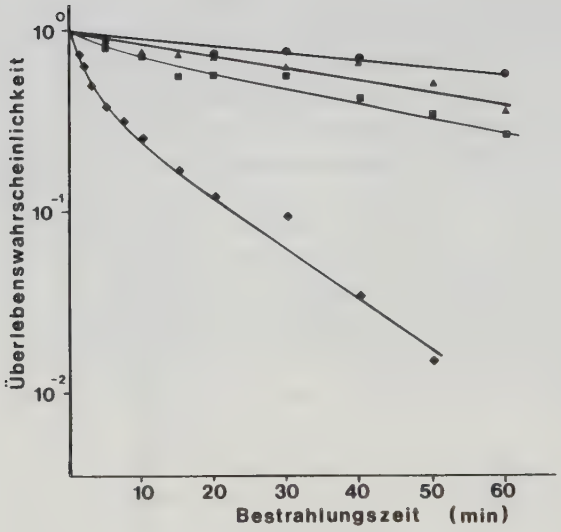


Abb. 20.: Dosis-Effekt-Kurven der atmungskompetenten Saccharomyces-Stämme 235-11 c rho$^+$ ●—●, 211-1 aM rho$^+$ ◆—◆, 2121-140 rho$^+$ ▲—▲ und 2105-15 rho$^+$ ■—■ nach photodynamischer Behandlung mit TP (1 µg/ml, 30 min DW).

Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung zu biochemischen Untersuchungen, die gezeigt haben, daß das Atmungsenergie liefernde System wesentlich sensibler auf photodynamische Behandlung anspricht als der Gärungsstoffwechsel (WATANABE, 1976), so daß während des photodynamischen Inaktivierungsverlaufs als erstes die Atmung und anschließend die Gärung inaktiviert werden.

Ein von den Stämmen 235-11 c und 2121-140 abweichendes Mutationsverhalten kennzeichnet sowohl Stamm 211-1 aM als auch Stamm 2105-15.

Stamm 2105-15 zeigt ebenfalls eine von der Überlebensrate weitgehend unabhängige rho⁻-Induktion. Verglichen mit den anderen Stämmen ist jedoch die stammspezifische Mutanteninduktion deutlich geringer: Eine maximale Induktion von 45 % Atmungsdefekten ab 60 % Überlebensrate weist auf eine gewisse Resistenz des cytoplasmatischen Atmungsapparates gegenüber photodynamischer Behandlung hin.

Die TP-induzierte rho⁻-Mutationsrate des Stammes 211-1 aM ist dagegen korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit und nimmt erst mit abnehmender Überlebensrate deutlich zu. 87 % induzierte Atmungsdefekte bei 3,5 % Überlebensrate zeigen einen charakteristischen Unterschied zu den rho⁻-Mutationskinetiken der Stämme 235-11 c und 2121-140. Das könnte bedeuten, daß bei Stamm 211-1 aM eine vorrangige Schädigung der mitochondrialen DNA mit nachfolgender Manifestation der cytoplasmatischen rho⁻-Mutation nicht erfolgt bzw. die Schädigung des zellulären Atmungsapparates für den Energie-verbrauchenden Stamm in den meisten Fällen letal verläuft.

3.3.5. Einfluß der Vorkultur auf die Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutationen nach photodynamischer Behandlung mit TP

Nach den zuvor durchgeführten Versuchen stellt sich die Frage nach dem Einfluß der Vorkultur auf die cytoplasmatische rho⁻-Induktion. Besteht die Einflußnahme bestimmter Vorkulturbedingungen auf die stammspezifische photodynamische Sensibilität vor allem in einer Modifikation der Bindungseigenschaften zellulärer Bestandteile gegenüber dem Farbstoff, so sollte die rho⁻-Mutagenese zusätzlich von den Wachstumsbedingungen, denen der Stamm ausgesetzt war, abhängig sein. Versuche mit Ethidium-Bromid (EB), einem äußerst wirksamen Agenz in der cytoplasmatischen Mutationsauslösung (SLONIMSKI et al., 1968), haben gezeigt, daß die mutagene Wirkung auf die Zellen nach Stammanzucht auf einem nicht fermentierbaren Medium (GARDELLA and Mc QUILLAN, 1977) oder nach Anzucht unter anaeroben

Wachstumsbedingungen (PINTO et al., 1975) um ein Vielfaches vermindert wird.

Um zu prüfen, ob ein Einfluß bestimmter, die photodynamische Sensibilisierung modifizierende Vorkulturbedingungen auf die Farbstoff-sensibilisierte rho⁻-Induktion vorhanden ist, wurden die Stämme einmal einer atmungsaktivierenden und sensibilitätserhöhenden Glycerinmedium-Anzucht unterzogen, zum anderen einer teilweise Resistenz erhöhenden Anzucht unter anaeroben Bedingungen ausgesetzt. Nach entsprechender Vorkultivierung wurden die stationären Zellen zum Zwecke der Induktion atmungsdefekter in 1 µg/ml TP dunkelinkubiert und anschließend mit sichtbarem Licht bestrahlt (0 - 40 min).

In den Abbildungen 21 und 22 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen graphisch dargestellt. Abbildung 21 zeigt die Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutationen der Stämme durch TP und Licht nach Glycerinmedium-Anzucht und Anaerob-Anzucht als Funktion der Bestrahlungszeit. Beim Vergleich der Graphiken werden unter Hinzuziehung der Abbildung 18 (Kapitel 3.2.4.) Unterschiede in der TP-induzierten cytoplasmatischen Mutationsauslösung erkennbar, die ihre Ursache zweifelsfrei in der Vorkultivierung des betreffenden Stammes haben müssen.

Nach Glycerinmedium-Anzucht ist die photodynamische Induktion von Atmungsdefekten durch 1 µg/ml TP bei Stamm 2105-15 während einer 40-minütigen Bestrahlungszeit gar nicht und bei Stamm 2121-140 nur in vermindertem Maße möglich. Stamm 211-1 aM zeigt unter gleichen Bedingungen bis zu 15 min Bestrahlung keine Induktion, weist jedoch ab 20 min Bestrahlungsdauer eine steile Zunahme an Atmungsdefekten auf. Eine leicht erhöhte rho⁻-Induktionsgeschwindigkeit zeigt Stamm 235-11 c. So hat der auf Glycerinmedium angezogene Stamm nach einer schnellen Zunahme an Atmungsdefizienten bereits nach 20 min Bestrahlung ein Maximum von 75 % induzierten rho⁻-Mutationen erreicht, gegenüber 75 % induzierten Atmungsdefekten nach 40 min Bestrahlung von VM-angezogenen Zellen des gleichen Stammes.

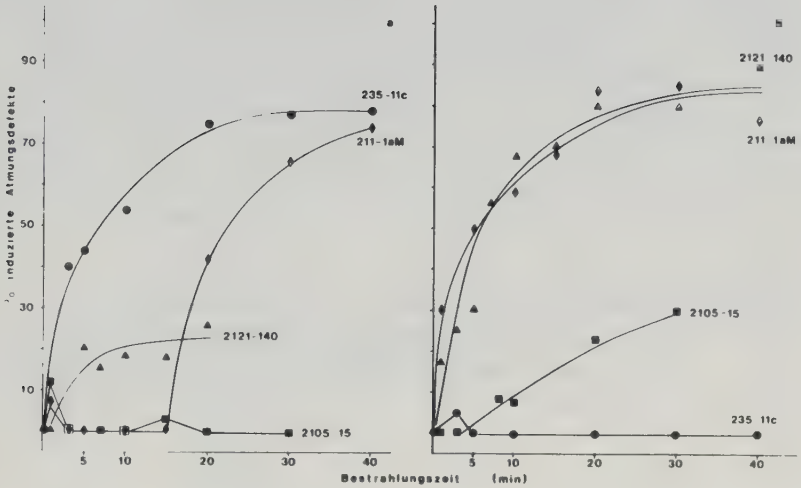
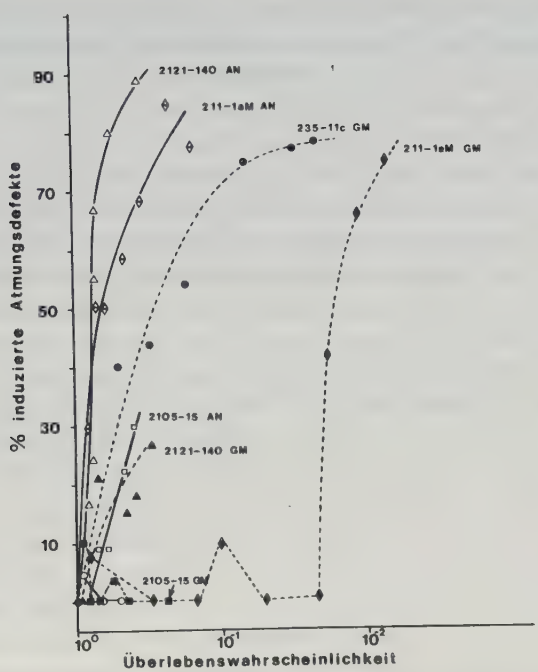


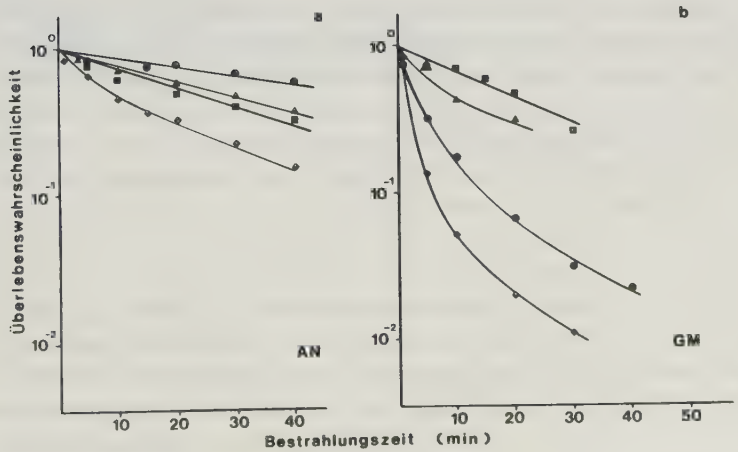
Abb. 21.: Einfluß der Vorkultur auf die Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutanten bei den Stämmen 235-11 c, 211-1 aM, 2121-140 und 2105-15 durch TB und Licht in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.
a) Anzucht auf Glycerinmedium, b) Anzucht auf Vollmedium unter anaeroben Bedingungen.

Nach Anaerob-Anzucht erweist sich Stamm 235-11 c als ausgesprochen resistent gegenüber photodynamischer Induktion von Mutationen zur Atmungsdefizienz mit TP. Innerhalb einer 40-minütigen Bestrahlung mit sichtbarem Licht werden keine rho⁻-Mutationen gesetzt. Alle anderen anaerob angezogenen Stämme zeigen nach photodynamischer Behandlung eine Bestrahlungszeit-abhängige Induktion atmungsdefekter Mutanten. Bei Stamm 2105-15 erfolgt eine leichte, in diesem Fall lineare, Zunahme an Atmungsdefekten. Stamm 2121-140 erfährt nach gleichen Anzuchtbedingungen eine Steigerung in der Zunahme an rho⁻-Mutationen. Diese werden mit der gleichen Frequenz induziert wie bei Stamm 211-1 aM, der nach Anaerob-Anzucht wieder eine sofort einsetzende starke Zunahme an Atmungsdefekten aufweist.

Abb. 22.: Einfluß der Vorkultur auf die Abhängigkeit photodynamisch induzierter atmungsdefekter Mutanten von der Überlebensrate.

Abb. 23.: DEK nach Anzucht der atmungsaktiven Elternstämme 235-11 c rho$^+$ ●—● , 211-1 aM rho$^+$ ◆— ◆, 2121-140 rho$^+$ ▲—▲ und 2105-15 rho$^+$ ■—■ auf Vollmedium unter anaeroben Wachstumsbedingungen (a) und auf Glycerinmedium (b) und anschließender photodynamischer Behandlung mit TP (1 µg/ml, 30 min DW).


% induzierte Atmungsdefekte
90
70
50
30
10
2121-140 AN
211-1aM AN
235-11c GM
211-1aM GM
2105-15 AN
2121-140 GM
2105-15 GM
10^0
10^{-1}
10^{-2}
Überlebenswahrscheinlichkeit


a
b
Überlebenswahrscheinlichkeit
10^0
10^{-1}
10^{-2}
AN
GM
10
20
30
40
50
Bestrahlungszeit (min)

Vorkultur-abhängige Unterschiede im photodynamischen Mutationsgeschehen mit TP zeigt Tabelle 8, in die der prozentuale Anteil induzierter rho$^-$-Mutationen für jeden Stamm nach 20 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht eingetragen ist.

Tabelle 8: Einfluß der Anzuchtbedingungen auf die Induktion von rho$^-$-Mutationen nach 30 min Dunkelinkubation der Stämme in TP (1 µg/ml) und anschließender 20 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Vorkultur	235-11 c	2121-140	2105-15	211-1 aM
VM	66 %	40 %	44 %	83 %
GM	75 %	26 %	0 %	42 %
AN	0 %	80 %	23 %	75 %

Trägt man die rho$^-$-Induktion als Funktion der Überlebensrate, die nach Anaerob-Anzucht teilweise erhöht und nach Glycerinmedium-Anzucht in allen Fällen vermindert ist, so erhält man die in Abbildung 22 dargestellten Induktionskurven.

Als einziger zeigt Stamm 2121-140 nach Anaerob-Anzucht eine von der Überlebenswahrscheinlichkeit weitgehend unabhängige rho$^-$-Mutagenese. Während die Überlebensrate während der gesamten Bestrahlungsdauer nicht unter 36 % Überlebensrate sinkt (vgl. Abbildung 23), werden in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit mit großer Effizienz rho$^-$-Mutationen zur Atmungsdefizienz gesetzt: 87 % induzierte Atmungsdefekte bei 37 % Überlebensrate.

Alle anderen Stämme zeigen nach Anzucht auf Glycerinmedium oder nach Anzucht unter anaeroben Wachstumsbedingungen eine mehr oder minder ausgeprägte Korrelation zwischen cytoplasmatischer Mutationsauslösung und Überlebenswahrscheinlichkeit. Sie ist am deutlichsten bei Stamm 235-11 c, der nach Glycerinmedium-Anzucht bei gleichzeitig sinkendem Anteil an Über-

lebenden eine zunehmende Sensibilität gegenüber photodynamischer Induktion zur Atmungsdefizienz erfährt: 80 % induzierte rho$^-$-Mutationen bei 2 % Überlebensrate.

Einen auffallenden Unterschied in der der Überlebensrate zugeordneten Vorkultur abhängigen photodynamischen Mutationsauslösung weist Stamm 211-1 aM auf. Während nach Anaerob-Anzucht die TP-abhängige rho$^-$-Mutationsinduktion mit Beginn der photodynamischen Behandlung bei anfänglich wenig reduzierter Überlebenswahrscheinlichkeit erfolgt, bewirkt eine Glycerinmedium-Anzucht bei diesem Stamm eine stark verzögerte Mutationsauslösung, die erst bei 2 % Überlebensrate mit hoher Frequenz einsetzt und bei 1 % Überlebensrate bereits 75 % induzierte Atmungsdefekte ausmacht.

Es lassen sich über die Vorkultur-abhängigen Induktionsversuche keine verallgemeinernden Aussagen treffen. Anders als bei den zuvor erwähnten Versuchen mit Ethidium-Bromid, führen Anzucht auf einem nicht fermentierbaren Medium und Anzucht unter anaeroben Wachstumsbedingungen nicht bei allen Stämmen gleichermaßen zu einer Reduktion der TP-abhängigen cytoplasmatischen Mutationsrate. Das Mutationsverhalten ist offenbar stammspezifisch und kann unter gegebenen Anzuchtbedingungen sowohl erhöht als auch erniedrigt werden bzw. negativ sein. Während die photodynamische Induktion von cytoplasmatischen rho$^-$-Mutationen nach Anzucht auf Standardvorkulturmedium bei allen Stämmen positiv verläuft, d.h. entweder vor oder während der photodynamischen Zellinaktivierung rho$^-$-Mutationen gesetzt werden, bewirken Anaerob-Anzucht bei Stamm 235-11 c und Glycerinmedium-Anzucht bei Stamm 2105-15 eine vollkommene Resistenz gegenüber photodynamischer Induktion von Atmungsdefekten. Unter diesen Anzuchtbedingungen verliert Thiopyronin seine mutagene Wirkung auf das mitochondriale Genom dieser beiden Stämme. Das könnte bedeuten, daß entweder ein Eindringen des Farbstoffs in die Mitochondrien durch Vorkultur-abhängige Modifikationen der Organellen unterbunden oder bei erfolgter intramitochondrialer

Konzentrierung des Photosensibilisators eine Bindung des Farbstoffs an die mitochondriale DNA verhindert wird.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigt Stamm 2121-140 eine zweifache Erhöhung in der Zunahme an Atmungsdefekten nach Anaerob-Anzucht, was wiederum auf eine Begünstigung der Bindung zwischen TP und dem mitochondrialen Target unter diesen Kulturbedingungen hindeutet.

Die größtenteils überlebensabhängige photodynamische Induktion cytoplasmatischer rho^--Mutationen nach den o.g. Anzuchtbedingungen deutet darauf hin, daß offensichtlich die gleichen innerzellulären Modifikationen, die die Vorkultur-abhängigen Schwankungen der stammspezifischen photodynamischen Sensibilität bewirken, ebenfalls die cytoplasmatische Mutationsauslösung beeinflussen.

3.4. Einfluß des Genoms auf die photodynamische Sensibilisierbarkeit der Stämme

3.4.1. Problemstellung

Die Mutation eines Gens kann bei einem Hefestamm zu mehr oder minder tiefgreifenden physiologischen Veränderungen führen. Meist tritt die Mutation erst unter gewissen Umweltbedingungen in Erscheinung. So wachsen temperatursensible Mutanten im Gegensatz zum isogenen Wildtyp nur in einem limitierten Temperaturbereich; rad-Mutanten weisen eine erhöhte Sensibilität gegenüber bestimmten Strahlen und verschiedenen chemischen Agenzien auf. Andere Mutanten wiederum unterscheiden sich vom Wildtyp durch bestimmte Aminosäurebedürftigkeiten, Antibiotikaresistenzen- bzw. -sensibilitäten. Das bedeutet, daß Unterschiede im Genotyp von Hefezellen immer dann sichtbar werden, wenn die völlig gleich behandelten Stämme ein unterschiedliches Verhalten zeigen.

Das vom Wildtyp abweichende Verhalten einer Zelle aufgrund einer Genmutation ist die Folge eines definierten Mutationsereignisses in einem Struktur- oder Regulatorgenbereich und den damit verbundenen Änderungen der von diesem Genbereich codierten Zellbestandteile bzw. Zellfunktionen.

So beruht die Adeninbedürftigkeit von ade-Mutanten auf einer Punktmutation, die zu einem nonsense-Codon im Ade 2-Locus und damit zum Abbruch der Proteinsynthese führt.

Bei strahlensensiblen Mutanten ist ein Reparatursystem durch einen genetischen Defekt blockiert. Eine Mutation im Strukturbereich, der für die Endonucleasefunktion codiert, blokkiert das Herausschneiden von UV-induzierten Pyrimidindimeren bei Excisions-Reparaturdefekten rad 2-Mutanten. Aber auch Mutationen in anderen der Excisions- oder Postreplikationsreparatur zugeordneten Genbereichen, die z.B. für Polymerasefunktionen Exonucleasefunktionen oder Ligasefunktionen codieren, führt zu Excisions-Reparatur- oder Postreplikations-Reparatur-defekten strahlensensiblen rad-Mutanten (Übersichtsarbeiten: WITKIN, 1976; HOWARD-FLANDERS, 1981; LASKOWSKI, 1981).

Die bei einem Stamm beobachtete spezifische Sensibilität kann demnach auf unterschiedlichen Mutationen in verschiedenen Genen beruhen. Die genaue Zuordnung eines genetischen Defekts zu einem definierten Mutationsschritt ist darum das wesentliche Ziel genetischer Analysen. Methodisch kommen hierbei Kreuzungsexperimente, Mutationsversuche und auch biochemische Untersuchungen zur Anwendung.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten soll darum untersucht werden, ob die photodynamischen Sensibilitätsunterschiede zwischen den Stämmen auf einer definierten Genmutation beruhen, z.B. in einem Genbereich, der das photodynamische Sensibilitätsverhalten einer Zelle kontrolliert, wie

es ROTH postulierte (ROTH et al., 1978), oder ob andere Ursachen dafür infrage kommen.

Eine Kreuzung des resistenten und des sensiblen Stammes miteinander (211-1 aM x 235-11 c) und die genetische Analyse der Sporulationsprodukte könnte Aufschluß über die genetischen Grundlagen der photodynamischen Sensibilität geben.

Eine andere Fragestellung betrifft den genetisch determinierten Sensibilitätsunterschied zwischen den reparaturdefekten rad-Stämmen (rad 2-20 und rad 9-4) und dem Wildtyp (RAD), der auf eine Beteiligung bestimmter Reparaturgene bei der Beseitigung photodynamisch induzierter Läsionen mit TP hindeutet. Versuche mit anderen Photosensibilatoren wie 8-MOP führten diesbezüglich zu positiven, d.h. die Reparatur von photodynamischen Schäden bestätigenden Ergebnissen. Dabei wurde nachgewiesen, daß die Reparatur von den gleichen Systemen ausgeführt wird, die auch für die Beseitigung von Strahlenschäden zuständig sind (AVERBECK and MOUSTACCHI, 1974, 1975; AVERBECK and AVERBECK, 1978; MILLER et al., 1982).

Da zwischen der Reparatur von genetischen Schäden und einer nuklearen Mutationsauslösung ein enger Zusammenhang besteht (ERRERA, 1977), sollten Mutationsexperimente mit den Stämmen zur Abklärung dieses Problemkreises beitragen. Gleichzeitig geben die Ergebnisse wieder Hinweise auf den molekularen Wirkort des PDE in der Hefezelle.

3.4.2. Einfluß unterschiedlicher Genotypen auf die photodynamische Sensibilität

Die genetisch nicht identischen Stämme 211-1 aM und 235-11 c, die zwei verschiedenen Ausgangsstämmen und Stammbäumen zuzuordnen sind, unterscheiden sich phänotypisch in Zellgröße, Wachstumsgeschwindigkeit und Kolonieform. Die durchschnittlich

kleineren Zellen des Stammes 211-1 aM ($\bar{V}$ = 24 μm^3) bilden weiße Kolonien mit gezackten Rändern, während die für einen haploiden Hefestamm recht großen Zellen des Stammes 235-11 c ($\bar{V}$ = 92 μm^3) infolge Adeninbedürftigkeit rote, kreisrunde Kolonien mit glatten Rändern vorweisen. Stamm 211-1 aM zeichnet sich gegenüber Stamm 235-11 c durch eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit aus (Abb. 24).

Aus den DEK der Abbildung 25 ist die direkte Wirkung des Genoms auf die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber dem PDE zu ersehen: Stamm 235-11 c ist ausgesprochen resistent, während sich Stamm 211-1 aM als hochsensibel erweist.

Für das Verhalten der Stämme gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP lassen sich zwei Erklärungen finden:

- Ursache des photodynamischen Sensibilisierungsunterschieds der Stämme kann entweder die polygene Wirkung der nichtidentischen Genome sein, oder
- eine spezielle Genmutation führt in einem der beiden Stämme zu erhöhter Sensibilität bzw. Resistenz.

Bei Vorliegen eines polygenen Effekts könnten Zellgröße und Wachstumsgeschwindigkeit einen Einfluß auf die Farbstoff-abhängige Sensibilisierung ausüben.

Zellvolumenabhängige Unterschiede in der Farbstoffaufnahme und Konzentrierung könnten theoretisch einen Einfluß auf die Farbstoff-Substrat-Bindung und auf die Trefferrate haben. Variationen der innerzellulären Farbstoffkonzentration ergeben sich bei unterschiedlichen Zellgrößen aufgrund folgender Zusammenhänge:

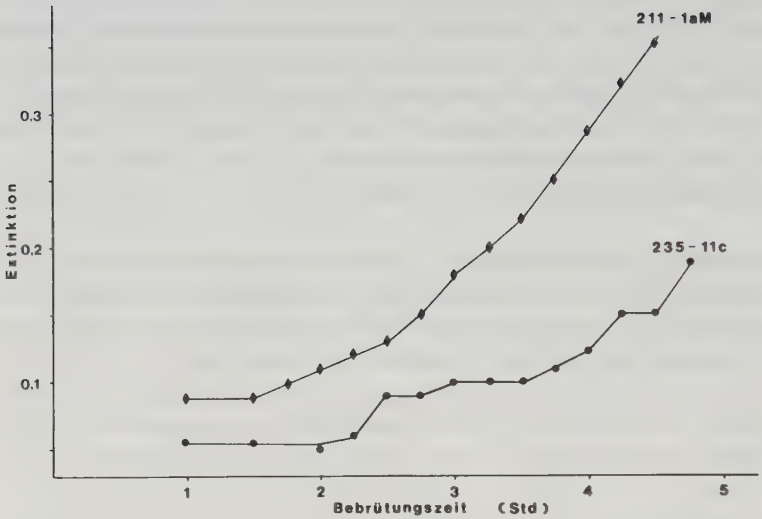


Abb. 24.: Wachstumskurven der Stämme 235-11 c und 211-1 aM unter Standardbedingungen.

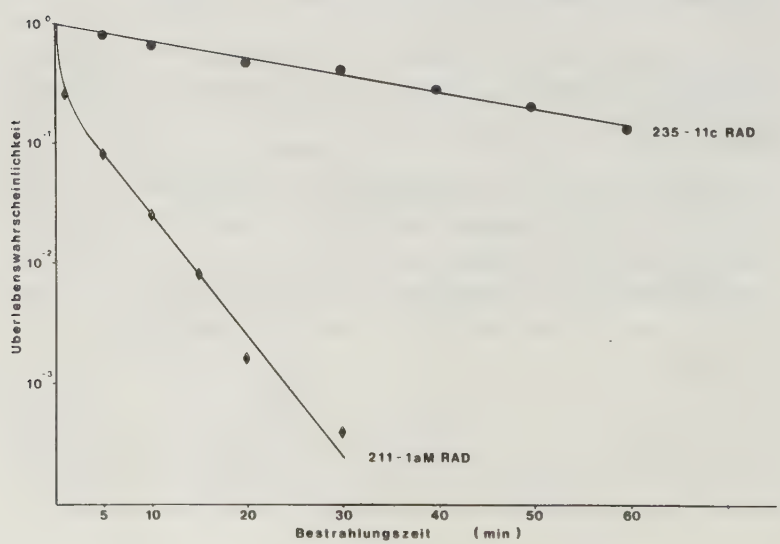


Abb. 25.: DEK der Stämme 235-11 c und 211-1 aM nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin (10 µg/ml, 30 min DW).

Obwohl über die größere Zelloberfläche des Stammes 235-11 c in der gleichen Zeiteinheit theoretisch mehr Farbstoff in die Zelle gelangen sollte, ist zu bedenken, daß die Größenzunahme von Oberfläche und Volumen nicht im gleichen Maßstab erfolgt, was aus den mathematischen Formeln zur Berechnung von Kugeloberfläche ($O = 4\pi r^2$) und Kugelvolumen ($V = 4\pi r^3/3$) hervorgeht. Das bedeutet, daß bei kleinen Zellen ein anderes Verhältnis von Volumen zu Zelloberfläche auftritt als bei großen Zellen, was sich in spezifischer Weise auf die zelluläre Farbstoffaufnahme und -konzentration auswirkt. So verfügen die kleinen Zellen des Stammes 211-1 aM bezogen auf ihr Volumen über eine relativ große Oberfläche zur Aufnahme des Farbstoffs, so daß dieser unter optimalen Bedingungen nach einer bestimmten Zeit in der Zelle in einer bestimmten Konzentration vorliegen wird. Dagegen weisen die Zellen von Stamm 235-11 c auf das Volumen bezogen eine relativ kleine Zelloberfläche zur Farbstoffaufnahme auf, so daß bei gleichen optimalen Aufnahmebedingungen nach einer bestimmten Zeit die innerzelluläre Farbstoffkonzentration im Vergleich zu Stamm 211-1 aM geringer sein muß.

3.4.2.1. Vergleich von TP-H^3 Aufnahmekinetiken

Zur Klärung des oben dargestellten Problemkreises kann ein Vergleich der Farbstoffaufnahme in die Zellen der unterschiedlich sensiblen Stämme beitragen.

Abbildung 26 zeigt die TP-H^3 Aufnahmekurven der Stämme 235-11 c und 211-1 aM. Der zelluläre Farbstoffgehalt nimmt über die Dauer der Inkubationszeit bei beiden Stämmen gleichmäßig zu. Die Aufnahmegeschwindigkeit des Farbstoffs in die Zellen sowie die Zahl der gebundenen Farbstoffmoleküle am Ende der Inkubationszeit in TP-Standardlösung (10 µg/ml) sind bei beiden Stämmen fast identisch. Da sich die Messung der Radioaktivität auf die Zellzahl bezieht (CPM/Zellzahl), bedeutet dieses Ergebnis, daß der Farbstoff (TP:Protein) in den größeren Zellen von Stamm 235-11 c in einer geringeren Konzentration vorliegt

als in den Zellen von Stamm 211-1 aM, was die zuvor beschriebenen Zusammenhänge zwischen Zellgröße und innerzellulärer Farbstoffkonzentrierung zu bestätigen scheint. Dies allein könnte eine Erklärung für den Sensibilitätsunterschied zwischen den beiden Stämmen sein, wonach die photodynamische Inaktivierungsrate von der innerzellulären Farbstoffkonzentration abhängen würde. Ob bei Stamm 235-11 c zusätzlich eine Farbstoffaufnahmeverzögerung, verursacht durch eine vom Genotyp abhängige Membranmodifikation, vorliegt, ist dennoch unklar. Wahrscheinlich ist auch eine beschleunigte Farbstoffaufnahme bei Stamm 211-1 aM aufgrund seines höheren Energieumsatzes und eine daraus resultierende Beschleunigung der innerzellulären inaktivierenden photochemischen Reaktionsprozesse.

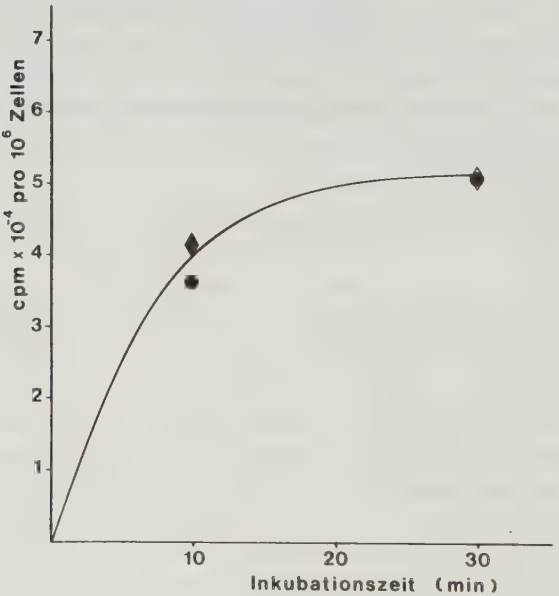


Abb. 26.: TP-H^3-Aufnahmekinetik der Stämme 235-11 c (●—●) und 211-1 aM (◆—◆) nach Anzucht unter Standard-Vorkulturbedingungen.

3.4.3. Einfluß verschiedener Aminosäurebedürftigkeiten auf die photodynamische Sensibilität

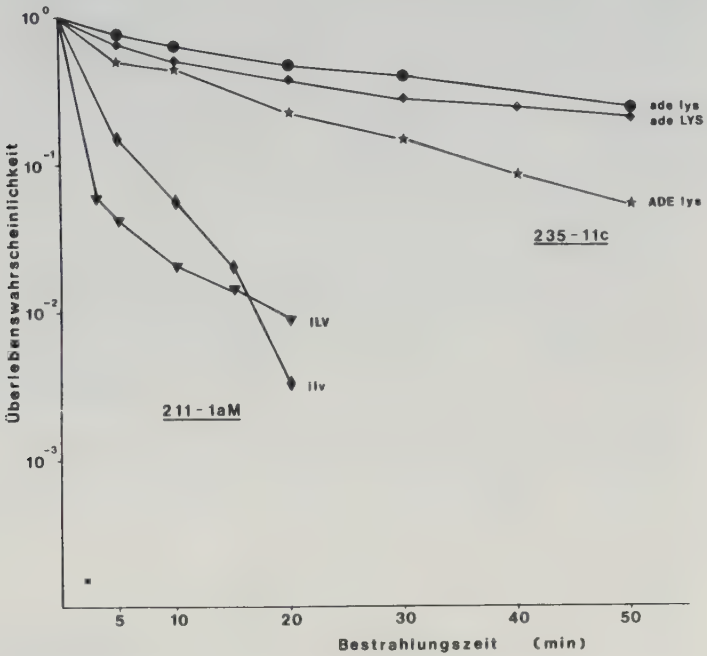


Abb. 27.: Photodynamische Sensibilität verschiedener Rückmutanten der Stämme 235-11 c und 211-1 aM.

Die Stämme 235-11 c und 211-1 aM besitzen unterschiedliche genetische Marker für verschiedene Aminosäurebedürftigkeiten. Die Unfähigkeit von Stamm 235-11 c zur Eigensynthese von Adenin, Lysin, Histidin und Uracil ist zurückzuführen auf eine Mutation in den Genloci Ade 2, Lys 2, His 3 und Ura 1.

Stamm 211-1 aM ist auxotroph für Isoleucin-Valin. Die kombinierte Aminosäurebedürftigkeit wird verursache durch eine Mutation im Genort IS 2 (AVERBECK, 1970), neuerdings als Ilv 2 bezeichnet.

Eine Korrelation zwischen der photodynamischen Sensibilität bzw. Resistenz und der Mutation eines dieser Gene erscheint zwar unwahrscheinlich, sollte aber trotzdem überprüft werden. Die photodynamische Behandlung von Rückmutanten dieser Stämme ermöglicht es, den Einfluß unterschiedlicher Genorte auf die photodynamische Sensibilität der Stämme zu prüfen.

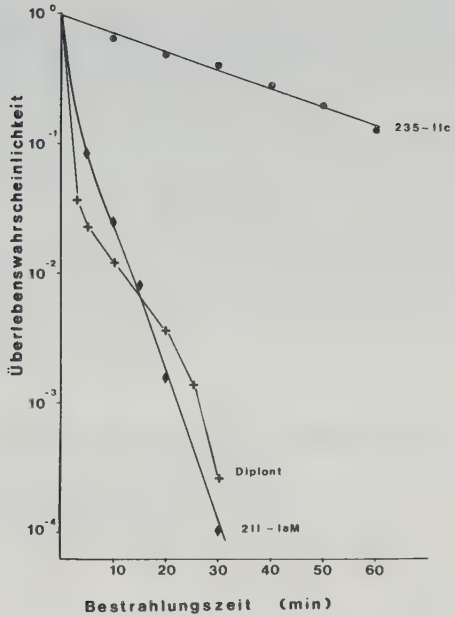
Abbildung 27 zeigt die DEK nach photodynamischer Behandlung verschiedener Revertanten der Stämme 235-11 c und 211-1 aM. Aus der Lage der Kurven ist zu ersehen, daß das Auftreten der photodynamischen Sensibilität bzw. Resistenz der Stämme 211-1 aM und 235-11 c nicht an die untersuchten Genorte gebunden ist, jedoch bewirken die Mutationen zur Aminosäureprototrophie eine Modulation der Sensibilität, so daß auch diesen Genorten ein gewisser Einfluß bei der Ausbildung des stammspezifischen photodynamischen Sensibilitätsverhaltens zukommen muß: Alle isolierten Rückmutanten, bei denen es sich infolge Rückmutation des ursprünglich mutierten Codons um echte Locusmutanten handelt, weisen eine Sensibilitätserhöhung gegenüber dem PDE auf. Interessant ist das Verhalten der Isoleucin-Valin-Rückmutante, deren DEK im Gegensatz zu 211-1 aM eine deutliche Schwänzung zeigt. Das bedeutet, daß die Zellen der Revertante im niederen Dosisbereich empfindlicher gegenüber photodynamischer Behandlung sind als der aminosäurebedürftige Elter. Mit andauernder Bestrahlungszeit verringert sich der Sensibilitätsunterschied zwischen auxotropher Mutante und prototropher Rückmutante. Nach 15 min Bestrahlung besitzen beide Stämme etwa die gleiche Sensibilität und nach 20 min Bestrahlung erfährt die Locusmutante im Vergleich zur Isoleucin-Valin-Mutante einen Resistenzzuwachs gegenüber photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin.

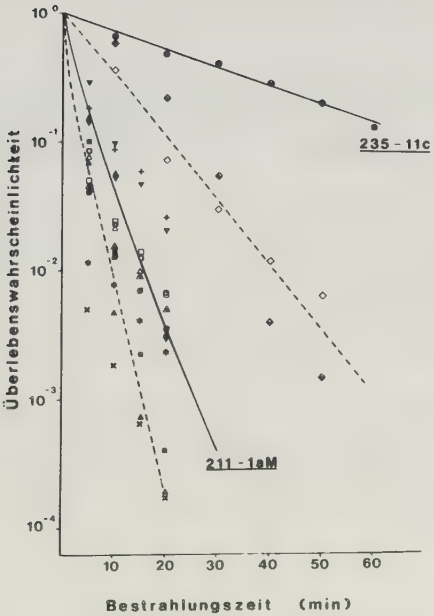
3.4.4. Untersuchungen zum Erbgang photodynamischer Sensibilität

ROTH beschrieb vor einiger Zeit die Isolierung einer TP-sensiblen Saccharomyces-Mutante, bei der man aufgrund von Kreuzungsversuchen und genetischen Analysen das Vorliegen eines die photodynamische Sensibilität verursachenden genetischen Defekts vermutete (ROTH et al., 1978). Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, daß sich diese Mutante und Stamm 211-1 aM in ihrer Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung nicht unterschieden (KENTER and LASKOWSKI, 1978). Es besteht daher die Möglichkeit, daß es sich bei den Stämmen 211-1 aM und 235-11 c um sogenannte photodynamisch sensible (211-1 aM) oder auch photodynamisch resistente (235-11 c) Mutanten handelt, deren Auftreten von einer Mutation in einem definierten Genort abhängt.

Eine Untersuchung über die Vererbung photodynamischer Sensibilität könnte zur Klärung dieser Frage beitragen, denn bei Vorliegen einer Genmutation sollte ein mendelnder Erbgang mit einer 2 : 2 Segregation für die Sensibilität und Resistenz zu erwarten sein. Um die erblichen Grundlagen der photodynamischen Sensibilität bzw. Resistenz zu ermitteln, wurden die Stämme 211-1 aM und 235-11 c miteinander gekreuzt und der so entstandene Diplont nach Testung seiner photodynamischen Sensibilität zur Sporulation angesetzt. Da eine anschließend durchgeführte Tetradenanalyse wegen der unzureichenden Menge an Asci mit vier lebensfähigen Sporen zu keinem Ergebnis führte, erfolgte die Isolierung der Sporen durch Massensporulation. Nach Aufwachsen der Sporenkulturen wurde die photodynamische Sensibilität der eindeutig klassifizierten Haplonten mit Hilfe des in Kapitel 2.6.5. beschriebenen Schnelltests bestimmt. Die DEK des Diplonten (Abb. 28) zeigt in etwa den gleichen Verlauf wie die des sensiblen Haplonten 211-1 aM. Das bedeutet, daß die photodynamische Sensibilität dominant vererbt wird.

Abb. 28 und 29: DEK des Diplonten aus der Kreuzung 235-11 c x 211-1 aM (28) und 15 isolierten Sporenkulturen (29) nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin.


Überlebenswahrscheinlichkeit
10 0
10 -1
10 -2
10 -3
10 -4
235-11c
Diplont
211-1aM
10
20
30
40
50
60
Bestrahlungszeit (min)


Überlebenswahrscheinlichkeit
10 0
10 -1
10 -2
10 -3
10 -4
235-11c
211-1aM
10
20
30
40
50
60
Bestrahlungszeit (min)

Die Testung von 100 Haplonten erbrachte die in Tabelle 9 aufgestellte Verteilung photodynamischer Sensibilität. Zum Vergleich wurde die Verteilung des Paarungstyps bestimmt, der eine eindeutige 2 : 2 Aufspaltung zeigt.

Tabelle 9

photodynamische Sensibilität			Paarungstyp		
wenig	mittel	hoch	a	α	gesamt
34	43	23	52	48	100

Im Anschluß wurden von 15 Sporenkulturen Dosis-Effekt-Kurven nach photodynamischer Behandlung erstellt. Die charakteristischen Kurvenverläufe der Stämme sind der Abbildung 29 zu entnehmen. Überraschenderweise bringt die Sporenanalyse keinen eindeutig photodynamisch resistenten Elterntyp hervor. Alle fünf getesteten Haplonten, denen man aufgrund des Schnelltests eine geringe photodynamische Sensibilität zuordnen konnte, sind sensibler als Stamm 235-11 c.

Von den photodynamisch behandelten hochsensiblen Sporenkulturen zeigen einige das gleiche Sensibilitätsverhalten wie Stamm 211-1 aM (Elterntypen), andere erweisen sich als noch sensibler als dieser.

Die DEK der Haplonten, die beim Schnelltest eine mittlere Sensibilität aufwiesen, liegen zwischen den Kurven der weniger sensiblen Stämme und den DEK der photodynamisch sensiblen Elterntypen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von ROTH et al. (1978) und ANDERSON und ROTH (1983), die anhand zahlreich durchgeführter Tetradenanalysen eine mendelnde 2 : 2 Aufspaltung für die Vererbung photodynamischer Sensibilität bzw. Resistenz nach-

weisen konnten, zeigen die hier nach Massensporulation isolierten Haplonten keine eindeutige 2 : 2 Aufspaltung in resistente und sensible Elterntypen.

Das Auftreten der unterschiedlich sensiblen Sporenkulturen, die sich sowohl von den Elterntypen als auch voneinander unterscheiden, deutet auf das Vorhandensein verschiedener Rekombinanten Typen hin, was auf eine mehr-Faktorenkreuzung hinweist. Das wiederum würde bedeuten, daß für die Kontrolle photodynamischer Sensibilität in diesem Fall mehr als ein Gen zuständig ist.

3.4.5. Einfluß der rad-Gene auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten

Es hat sich gezeigt, daß die bisher identifizierten zellulären Reparatursysteme nicht nur Strahlenschäden beheben, sondern z.T. auch Schäden, die durch chemische oder photodynamische Behandlung der Zellen entstanden sind (LASKOWSKI and LEHMANN-BRAUNS, 1973; AVERBECK and MOUSTACCHI, 1975; CHANET et al., 1975; AVERBECK and AVERBECK, 1978). Bisher fehlt jedoch der Beweis für die Reparatur von Schäden, die in der eukaryontischen Zelle in Gegenwart von Thiopyronin erzeugt werden. Nach GEISSLER (1967) und LOCHMANN und STEIN (1968) könnte das bedeuten,

- daß Schäden, die durch den PDE induziert werden, vom Reparatursystem der eukaryontischen Zelle nicht erkannt werden, oder
- daß aufgrund der photodynamischen Behandlung alle zellulären Reparatursysteme weitgehend inaktiviert werden, oder
- daß der an die DNA gebundene Farbstoff das enzymatische Reparatursystem hindert, photodynamische Schäden zu reparieren.

Im Hinblick auf die Richtigkeit einer dieser Thesen sollten sich strahlensensible und strahlenresistente Saccharomyces-Stämme nicht wesentlich in ihrer Sensibilität gegenüber dem PDE unterscheiden. Entsprechend negativ waren Ergebnisse, die man nach photodynamischer Behandlung eines strahlensensiblen Stammes erhielt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im photodynamischen Inaktivierungsverlauf der Mutante und dem strahlenresistenten Ausgangsstamm festgestellt werden (LASKOWSKI et al., 1968).

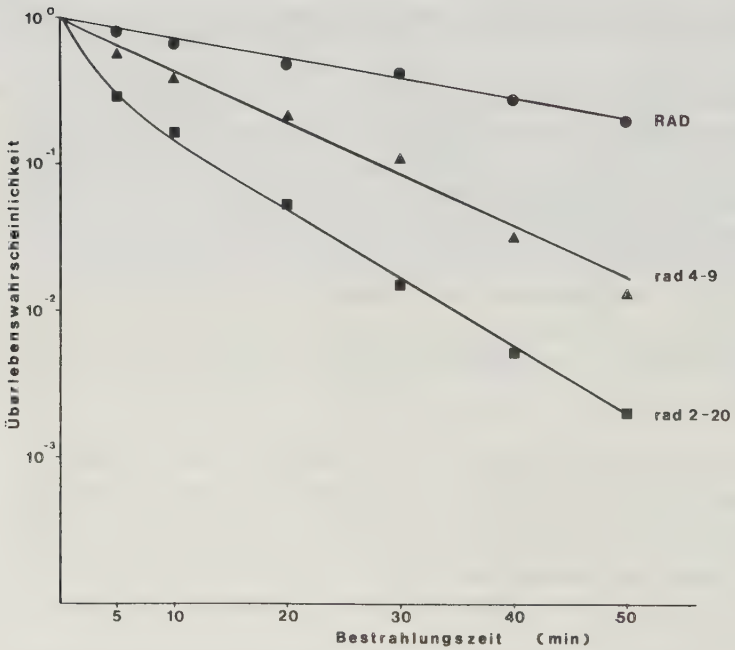


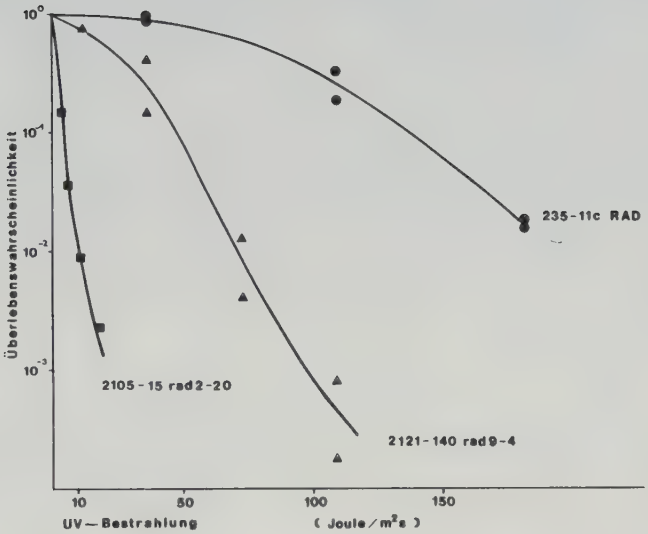
Abb. 30.: Dosis-Effekt-Kurven der strahlensensiblen Mutanten (rad 9-4 und rad 2-20) und des Wildtyps (RAD) nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin.

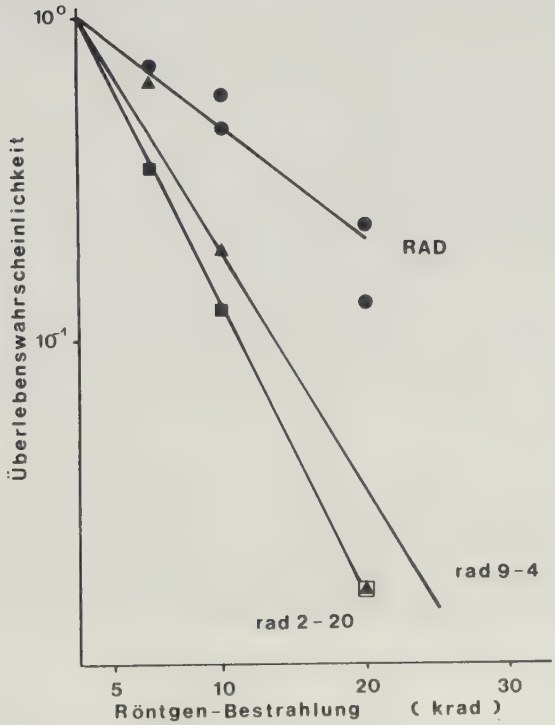
Die photodynamische Behandlung weiterer rad-Mutanten sollte darum zur Klärung dieses Problems beitragen.

Die zu Stamm 235-11 c (RAD) isogenen strahlensensiblen Stämme 2121-140 (rad 9) und 2105-15 (rad 2) scheinen für die nachfolgenden Versuche besonders geeignet, da sie einen Defekt in zwei unterschiedlichen Reparaturwegen aufweisen: Eine Mutation, die das praereplikative Excisions-Reparatur-System betrifft (rad 2) und eine Mutation im postreplikativen Rekombinations-Reparatur-System (rad 9).

Die DEK der Abbildung 30 zeigen das Ausmaß photodynamischer Sensibilität der strahlensensiblen rad-Mutanten nach photodynamischer Behandlung mit TP. Im Vergleich zum Ausgangsstamm 235-11 c ergeben sich unter Berücksichtigung der LD_{10} Dosisreduktionswerte von 2,5 für Stamm 2121-140 und 5,2 für Stamm 2105-15. Das beweist eindeutig, daß bei den hier untersuchten Stämmen eine Strahlensensibilität verursachende Mutation in den Reparaturbereichen RAD 9 und RAD 2 Einfluß auf die photodynamische Inaktivierungsrate der Zellen hat. Eine Reparatur photodynamischer Schäden in Gegenwart von TP durch die zellulären Reparatursysteme scheint aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen. Gleichzeitig wird die unterschiedliche Wirkung verschiedener rad-Gene auf die photodynamische Sensibilisierung eines Stammes deutlich. So zeichnet sich der durch hohe UV- und mittlere Röntgensensibilität (Abb. 31 und 32) charakterisierte Endonucleasedefekte rad 2-Stamm auch nach photodynamischer Behandlung mit TP durch eine höhere Sensibilität aus. Der mittlere UV- und Röntgensensibilität aufweisende rad 9-Stamm erweist sich demgegenüber als die photodynamisch resistentere Mutante.

Abb. 31 und 32.: UV- und Röntgen-Dosis-Effekt-Kurven der strahlensensiblen Mutanten 2121-140 rad 9-4 und 2105-15 rad 2-20 und des strahlenresistenten Wildtyps 235-11 c RAD.


Überlebenswahrscheinlichkeit
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
235-11c RAD
2105-15 rad2-20
2121-140 rad9-4
10
50
100
150
UV—Bestrahlung
(Joule/m²s)


Überlebenswahrscheinlichkeit
10^0
10^-1
RAD
rad 9-4
rad 2-20
5
10
20
30
Röntgen-Bestrahlung
(krad)

3.4.6. Induktion von Genmutationen nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin

Die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche an zwei strahlensensiblen Saccharomyces-Stämmen deuten auf eine Reparatur photodynamischer DNA-Schäden hin. Das hieße, daß entgegen den bisher gewonnenen Erkenntnissen über die photodynamische Zellinaktivierung mit TP der Farbstoff in den Zellkern gelangen und an die DNA binden müßte. In diesem Fall könnten neben cytoplasmatischen Schädigungen auch genetische Schäden gesetzt werden.

Zur Klärung dieses Problemkreises wurden Mutationsexperimente mit TP durchgeführt. Zum einen kann eine mutagene Wirkung von TP als Beweis für das Eindringen des Farbstoffs in den Zellkern gewertet werden, zum anderen entsteht vielleicht die Möglichkeit - wie bei der UV-induzierten Mutagenese - anhand des photodynamischen Mutationsgeschehens Kenntnisse über die Beteiligung prae- und postreplikativer Reparatursysteme an der Beseitigung photodynamischer DNA-Schäden zu gewinnen.

Die Mutagenität von Thiopyronin wurde in einem Rückwärtsmutationssystem der Hefestämme getestet. Es beruht auf der Bestimmung der Revertanten, die infolge einer Rückmutation in den Allelen ade 2-1, lys 2-1 und ilv 2 die Fähigkeit zur Adenin-, Lysin- und Isoleucin-Valin-Synthese besitzen, d.h. konkret formuliert: Es wurden die Mutationsschritte ade → ADE und lys → LYS bei den Stämmen 235-11 c, 2105-15 und 2121-140 untersucht sowie das Mutationsereignis ilv → ILV bei Stamm 211-1 aM.

Die Ergebnisse der zahlreichen Mutationsexperimente mit TP sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Bis auf Stamm 2105-15 zeigt keiner der photodynamisch behandelten Stämme eine signifikante Erhöhung der Mutationsrate über den spontanen Anteil hinaus. Eine graphische Auftragung der experimentell

Tabelle 10: Anzahl der Revertanten im Rückmutationstest nach photodynamischer Behandlung der Stämme mit TP sowie Angabe der daraus errechneten Mutationsraten zur Aminoäsure-Prototrophie

Stamm	Behandlung	Überlebende in % der Kontrolle	Anzahl der Revertanten/10^7 Zellen				Mutanten / Überlebende			
			ADE	LYS	ADE/LYS	ISO/VAL	ADE	LYS	ADE/LYS	ISO/VAL
235-11 c	unbehandelt	100 %	79	106	3	-				
	10 µg TP/ml, 30 min Dunkelwirkung	93 %	74	97	1	-	$8x10^{-8}$			
	10 µg TP/ml, 30 min DW u. anschl. Bestrahlung von 1 - 40 min	70 % 60 % 50 %	1 1 1	18 33 35	- - -	-				
211-1 aM	unbehandelt	100 %				50				
	10 µg TP/ml, 30 min Dunkelwirkung	90 %				53				
	10 µg TP/ml, 30 min DW u. ansch. Bestrahlung von 1 - 20 min	25 % 6 % 1 %				12 1 -				
2105-15	unbehandelt	100 %	27	27	20					
	10 µg TP/ml, 30 min Dunkelwirkung	95 %	21	20	16		-	-	-	
	10 µg TP/ml, 30 min DW u. anschl. Bestrahlung von 1 - 40 min	70 % 30 % 10 %	8 8 6	14 4 4	7 4 4		$5x10^{-6}$	$2,2x10^{-6}$	$3,3x10^{-6}$	
2121-140	unbehandelt	100 %	47	30	3					
	10 µg TP/ml, 30 min Dunkelwirkung	92 %	62	35	3		$3,3x10^{-6}$	$1,1x10^{-6}$		
	10 µg/TP/ml, 30 min DW u. anschl. Bestrahlung von 1 - 40 min	70 % 50 % 30 %	- 1 2	3 14 24	- - -			$3,2x10^{-6}$ $1,1x10^{-5}$		

ttelten Daten, die eine Abhängigkeit der TP-induzierten
in-, Lysin- und Isoleucin-Valin-Mutationsraten von der
rahlungszeit bzw. der Überlebenswahrscheinlichkeit auf-
en, war daher nicht möglich.

beiden strahlenresistenten RAD-Stämme 235-11 c und
1 aM zeigen unabhängig von ihrem photodynamischen Sensi-
tätsverhalten außer im TP-Dunkelversuch keine Mutations-
ktion. Die Vermutung, daß insbesondere Stamm 211-1 aM
vergleichbare Erhöhung der Mutationsrate zeigen würde,
sie für den photodynamisch sensiblen Stamm S 36 nachge-
en werden konnte (KENTER and LASKOWSKI, 1978), ließ sich
t bestätigen. Offensichtlich beruht die photodynamische
ibilität der Stämme 211-1 aM und S 36 auf unterschiedli-
Ursachen.

egenüber führte die photodynamische Behandlung der strah-
ensiblen rad-Stämme gelegentlich zu einer geringen Mutan-
Induktion. Die Mutationsraten blieben jedoch klein, und
Ergebnisse der einzelnen Mutationsversuche erwiesen sich
als widersprüchlich, so daß eine allgemeingültige Aussage
die TP-abhängige photodynamische Induktion von Genmuta-
en nicht möglich ist.

end UV-Bestrahlung bei dem Excisions-Reparatur-defekten
2-Stamm zu einem steilen Anstieg der Mutationsrate führt
ARDT, 1974), hervorgerufen durch das fehlerhaft arbeiten-
ostreplikations-Reparatur-System, bewirkt die photodyna-
he Behandlung dieses Stammes keine vergleichbare Reaktion.
eigt das gleiche Verhalten wie der photodynamisch behan-
e rad 9-Stamm, der nach UV-Bestrahlung etwa das gleiche
tionsverhalten aufweist wie der vorwiegend fehlerfrei
rierende Wildtyp (ECKARDT, 1974).

st demzufolge nicht möglich, aufgrund der hier durchge-
ten Versuche aus dem Mutationsverhalten der Stämme Rück-

schlüsse über die Beteiligung bestimmter Reparatursysteme an der Beseitigung photodynamischer Schäden zu ziehen. Trotzdem deuten die Ergebnisse darauf hin, daß TP als schwaches Mutagen in geringen Mengen in den Zellkern gelangen und dort genetische Schäden verursachen kann. Diese werden von der reparaturkompetenten Zelle offensichtlich fehlerfrei beseitigt, während die mangelnde Verfügbarkeit eines Reparaturgenprodukts gleichzeitig zu einer photodynamischen Sensibilitätserhöhung und einer geringfügigen Mutationsinduktion führen kann.

Die Versuchsergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit TP-Mutationsexperimenten, die von MARQUARDT und v. LAER (1966) und von LOCHMANN et al. (1964) durchgeführt wurden. Beide Autoren konnten ebenfalls nur sehr niedrige Mutationsraten nachweisen.

3.4.7. Einfluß der Vorkultur auf das Mutationsverhalten nach photodynamischer Behandlung mit TP

TP, unter Standard-Vorkulturbedingungen angewendet, erweist sich als äußerst schwaches Mutagen. Im Hinblick auf die in Kapitel 3.2. und 3.3. erzielten Ergebnisse stellt sich jedoch die Frage, ob auch die mutationsauslösende Wirkung dieses Farbstoffs durch vorkulturabhängige oder cytoplasmatische Faktoren beeinflußbar ist. Es soll darum geprüft werden, ob eine durch Glycerinmedien-Anzucht erzielte Änderung des physiologischen Zellzustandes, verbunden mit einer Erhöhung der Farbstoffinnenkonzentration (siehe Kapitel 3.2.6.), die mutagene Wirkung steigern kann.

Tatsächlich führten Mutationsexperimente mit TP, die nach Anzucht der Stämme auf Glycerinmedium durchgeführt wurden, diesbezüglich bei drei Stämmen zu positiven Ergebnissen. In Abbildung 33 sind die nach Kapitel 2.5.7. und 2.7.3. experimentell und rechnerisch ermittelten Mutationsraten zur Adenin-

(ADE), Lysin- (LYS) und Adenin-Lysin- (ADE/LYS) Prototrophie logarithmisch über der Bestrahlungszeit aufgetragen. Die Werte zur Bestimmung der ADE- und LYS-Locusmutationsraten erfassen alle auf den entsprechenden Mangelmedien aufgewachsenen Mutanten abzüglich der auf Adenin-Lysin-Mangelmedium aufgewachsenen Doppelmutanten. Die Bestimmung der Suppressormutanten erfolgte durch Auszählung der auf Adenin-Lysin-Mangelmedium aufgewachsenen Kolonien, deren Zahl zur Berechnung der ADE/LYS-Mutationsrate herangezogen wurde.

Die Graphiken zeigen bei den untersuchten Stämmen für verschiedene Loci eine Abhängigkeit der Mutationsrate von der Bestrahlungszeit. Während bei den Stämmen 235-11 c und 2121-140 ausschließlich induzierte LYSIN-Revertanten auftreten, zeigt Stamm 2105-15 eine Erhöhung der ADE- und ADE/LYS-Mutationsraten. Das bedeutet, daß bei den erstgenannten Stämmen nachweislich nur Locus-Mutanten induziert werden, während bei Stamm 2105-15 nach GM-Anzucht sowohl Locus als auch Suppressormutationen auftreten. Die untersuchten Locus-Codone der Stämme zeichnen sich durch unterschiedliche Sensibilität gegenüber dem mutagenen Farbstoff aus. So ist bei den Stämmen 235-11 c und 2121-140 die Mutationschance des ade-Codons nach photodynamischer Behandlung mit TP gegenüber dem lys-Codon stark herabgesetzt bzw. Null. Stamm 2105-15 zeigt ein entgegengesetztes Mutationsverhalten der untersuchten Locus-Codone, das sich durch eine Erhöhung der ADE-Rate auszeichnet. LYSIN-Revertanten werden nicht induziert bzw. sind experimentell nicht nachzuweisen.

Ein Vergleich der ADE- und LYS-Kurven macht deutlich, daß die Stämme in etwa die gleiche Mutabilität besitzen. Der strahlenresistente RAD-Stamm und die strahlensensiblen rad 2- und rad-9-Stämme zeigen für die untersuchten Genloci ungefähr den gleichen Anstieg der Mutationskurven. Das heißt, es werden abhängig vom Genort in den Stämmen bei gleicher Bestrahlungszeit mit gleicher Effizienz Mutationen gesetzt, und zwar unabhängig von der Sensibilität des Koloniebildungsvermögens wie aus Tabelle 11 ersichtlich.

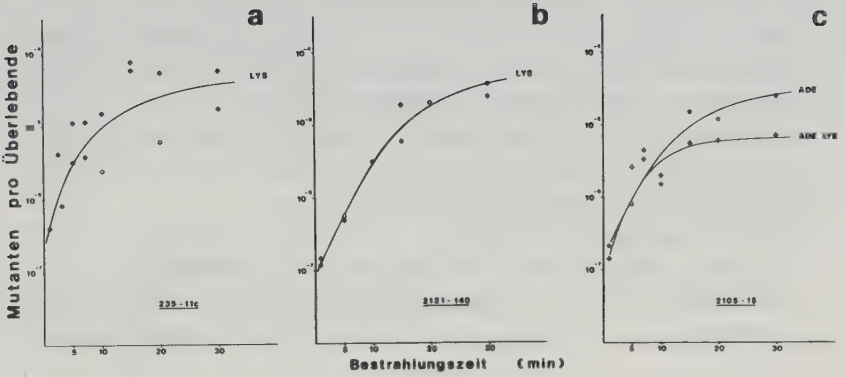


Abb. 33.: Durch TP und Licht induzierte Mutationen zur ADENIN- und LYSIN-Prototrophie sowie ADE/LYS-Suppressormutationen bei den Stämmen 235-11 c (a), 2121-140 (b) und 2105-15 (c) nach Anzucht auf Glycerinmedium.

Die Auftragung der Mutationsrate als Mutanten pro Überlebende erfolgte in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (semilogarithmische Auftragung).

Tabelle 11: Vergleich der ADE- und LYS-Locusmutationsraten der Stämme nach 30 min Dunkelinkubation in TP 10 µg/ml und anschließender 15 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Stamm	Mutationsrate ade → ADE	Mutationsrate lys → LYS	Überlebensrate
235-11 c RAD	--	3×10^{-5}	$4{,}3 \times 10^{-3}$
2121-140 rad 9	--	2×10^{-5}	$5{,}5 \times 10^{-2}$
2105-15 rad 2	$1{,}6 \times 10^{-5}$	--	$7{,}3 \times 10^{-2}$

Beim Vergleich der photodynamischen TP-Mutabilität verschiedener Systeme wie sie die hier untersuchten RAD-, rad 2- und rad 9-Stämme darstellen, kann ebenso die Mutantenertrag-Funktion Anwendung finden. Diese Funktion ist die Darstellung des Mutantenertrags, der durch Mutanten pro behandelte Zellen definiert ist (siehe Kapitel 2.7.3.). Die Funktion bietet gegenüber der herkömmlichen Darstellungsart der Mutationsfrequenz (Mutanten pro Überlebende) folgende Vorteile:

- Es lassen sich gleichzeitig die mutagene und die letale Wirkung eines Agenz beschreiben.

- Es läßt sich die Wahrscheinlichkeit der tatsächlich lebenden Mutanten in einer behandelten Population abschätzen.

- Es läßt sich der Bereich maximaler Mutagenität bestimmen.

Die graphische Auftragung des Mutantenertrags kann entweder über der verabreichten Dosis oder über den letalen Treffern erfolgen. Ein Plot über den Letaltreffern erscheint im vorliegenden Fall der photodynamischen Mutagenitätstestung von TP von Vorteil, da letale Treffer eine biologische Dosis für Agentien darstellen, deren aktuelle Dosis nicht eindeutig messbar ist.

Die Abbildungen 34 und 35 zeigen beide obengenannten Darstellungsweisen. Der Mutantenertrag liegt bei allen Stämmen zwischen 1 und 10 induzierten Mutanten pro 10^7 behandelten Zellen und ist demnach als gering zu werten. Die Kurven sind glockenförmig. Während die aufsteigenden Kurventeile die mutagene Wirkung (Induktion von Mutanten) nach photodynamischer Behandlung beschreiben, zeigen die absteigenden Äste die letale Wirkung (Abtötung von Mutanten) an. Im Bereich des Kurvenmaximums besteht ein Gleichgewicht zwischen Zugewinn durch Induktion und Abtötung der Mutanten. Es ist gleichzeitig der

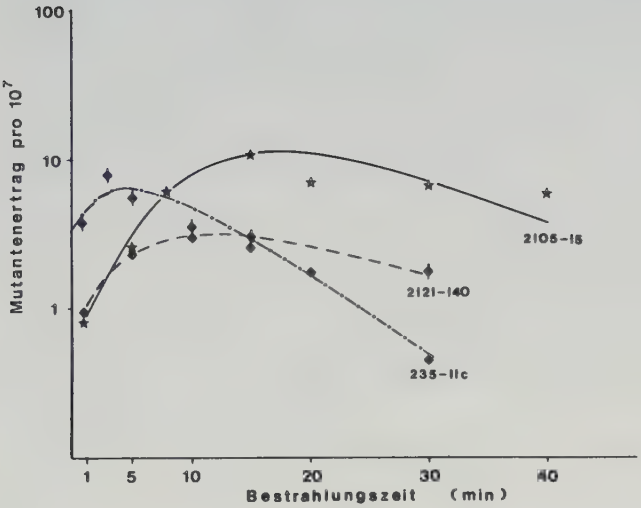
Bereich, in dem die höchste Zahl an tatsächlich lebenden Mutanten zu erwarten ist. Ein Vergleich der Kurven in Abbildung 34 zeigt, daß der Dosisbereich, in dem die mutagene Wirkung des Farbstoffs zu einem realen Zugewinn induzierter Mutanten führt, für die drei Stämme unterschiedlich groß ist. 30 min Dunkelinkubation in TP (10 µg/ml) erzielen bei Stamm 235-11 c nach 3 min Bestrahlung und bei Stamm 2121-140 nach 10 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht den höchsten Betrag induzierter überlebender LYS-Revertanten in der behandelten Population. Bei Applikation von Dosen, die eine Bestrahlungszeit › 3 min, respektive › 10 min erfordern, übersteigt die letale Wirkung die genetische Wirkung des Photosensibilisators auf die Stämme, so daß die induzierten Mutanten in zunehmendem Maße wieder abgetötet werden. Der maximale ADE-Mutantenertrag findet sich bei Stamm 2105-15 nach 15 min Bestrahlung.

Eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit,mit der tatsächlich überlebende Mutanten bei den photodynamisch behandelten Stämmen zu erwarten sind, ist anhand der Abbildung 35 möglich. Die Zahl der überlebenden Mutanten nimmt zunächst in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Zahl der Treffer pro Zelle, die einen Letalschaden hervorrufen, zu. Das ist logisch, da das Mutationsereignis auf einer fehlerhaften Reparatur der durch wirksame Treffer geschädigten Zelle beruht. Durchschnittlich ein Letaltreffer pro Zelle ist bei Stamm 235-11 c zur Induktion des höchsten überlebenden Mutantenertrags erforderlich. Stamm 2121-140 bedarf dazu zwei Letaltreffern pro Zelle und Stamm 2105-15 sogar 2,5 Letaltreffer pro Zelle.

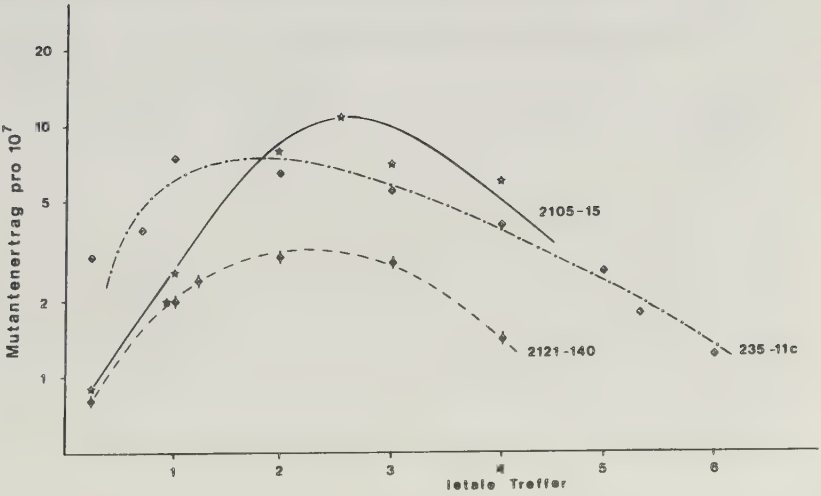
Bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit fand die Poisson-Verteilung (siehe Kapitel 2.7.3.2.) Anwendung. Unter der Voraussetzung, daß durchschnittlich ein Treffer pro Zelle notwendig ist, um einen Letalschaden hervorzurufen und alle Treffer zufallsverteilt werden, beträgt die Wahrscheinlichkeit, daß kein Letalschaden in einer Zelle auftritt, 0,37. Da dieser Wert für alle überlebenden, normale sowie mutierte Zellen gilt,

Abb. 34 und 35.: Durch photodynamische Behandlung mit Thiopyronin induzierte Rückmutationen zur ADENIN- und LYSIN-Prototrophie nach Anzucht der Stämme 235-11 c, 2121-140 und 2105-15 auf Glycerinmedium.
Die Auftragung der Mutationsraten als Mutantenertrag erfolgte in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (Abb. 34, semilogarithmische Auftragung) und in Abhängigkeit von den letalen Treffern (Abb. 35, doppeltlogarithmische Auftragung).
Es kennzeichnen wiederum ◆—◆ die LYS-Rate und ✸—✸ die ADE-Rate.

34


100
10
1
Mutantenertrag pro 10^7
2105-15
2121-140
235-11c
1
5
10
20
30
40
Bestrahlungszeit (min)

35


20
10
5
2
1
Mutantenertrag pro 10^7
2105-15
2121-140
235-11c
1
2
3
4
5
6
letale Treffer

gibt er die Wahrscheinlichkeit an, mit der die durch einen Letaltreffer pro Zelle induzierten Mutanten tatsächlich überleben. Die Überlebenswahrscheinlichkeit des maximalen Mutantenertrags ist am größten bei Stamm 235-11 c, gefolgt von Stamm 2121-140 und am geringsten bei Stamm 2105-15.

Die Versuche haben gezeigt, daß TP - unter bestimmten Umweltbedingungen angewendet - durchaus eine mutationsauslösende Wirkung entfalten kann. Ob diese genetische Wirkung des Photosensibilisators einen realen Zugewinn an induzierten Mutanten schafft, hängt jedoch nicht nur von den Vorkulturbedingungen ab, sondern auch vom Stamm und den untersuchten Genloci. So zeigte Stamm 211-1 aM auch nach GM-Anzucht keine Mutabilität des ilv2-Locus.

Gleiche Genorte in verschiedenen Stämmen weisen ein unterschiedliches Mutationsverhalten bei photodynamischer Behandlung mit TP auf, was auf eine locusspezifische Beeinflussung der Stämme bei der photodynamischen Mutationsauslösung hindeutet.

3.4.8. Mutationsverhalten von atmungsdefizienten Saccharomyces-Stämmen nach photodynamischer Behandlung mit TP

Nachdem bei GM-angezüchteten Saccharomyces-Stämmen in drei Fällen eine eindeutige Erhöhung der Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung mit TP nachgewiesen werden konnte, erhebt sich nun die Frage hinsichtlich einer cytoplasmatischen Beeinflussung des photodynamischen Mutationsgeschehens. Eine Untersuchung dieses Problems erscheint sinnvoll, da es sich bei dem von ROTH et al. (1978) isolierten Stamm S 36, der nach photodynamischer TP-Behandlung eine hohe Mutabilität aufweist, ebenfalls um einen atmungsdefekten rho^--Stamm handelt.

Mutationsversuche an den in Kapitel 3.2.2. beschriebenen spontanen und TP-induzierten Atmungsdefekten der untersuchten Stämme sollen klären, ob durch TP ausgelöste photodynamische Mutabilität stammspezifisch ist oder als besondere Eigenart atmungsdefekter Zellen gewertet werden muß. Im zuletzt genannten Fall sollten alle rho^--Stämme eine signifikante Erhöhung der Mutationsrate aufweisen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß dies nicht zutrifft. Alle Mutationsexperimente an spontanen sowie TP-induzierten Atmungsdefekten des Stammes 211-1 aM verliefen negativ. Wie schon bei den zuvor durchgeführten Versuchen unter Standard-Vorkulturbedingungen und GM-Anzuchtbedingungen konnte auch bei Atmungsdefizienz dieses Stammes keine Mutanteninduktion nach photodynamischer Behandlung festgestellt werden. Demgegenüber zeigen alle getesteten atmungsdefekten Mutanten der Stämme 235-11 c, 2121-140 und 2105-15 eine dosisabhängige und locusspezifische Erhöhung der Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung mit TP. Es konnten sowohl durch TP und Licht induzierte ADE- und LYS-Locusmutanten als auch ADE/LYS-Suppressormutationen bei den verschiedenen spontanen und induzierten rho^--Stämmen nachgewiesen werden.

In den Abbildungen 36 bis 43 sind die Mutationswerte als Mutationsfrequenz (Mutanten pro Überlebende) und als Mutantenertrag logarithmisch über der Bestrahlungszeit oder doppeltlogarithmisch über der Letal-Treffer-Dosis aufgetragen. Aus den Graphiken wird das Mutationsverhalten der Stämme bei spontaner oder TP-induzierter Atmungsdefizienz sichtbar: Atmungsdefekte des Stammes 235-11 c zeigen im Gegensatz zum GM-angezüchteten rho^+-Stamm neben der erhöhten Mutabilität des lys-Locus auch eine Induktion von ADE-Mutanten. Die ADE-Rate fällt jedoch wesentlich niedriger aus als die LYS-Rate (Abb. 36). Suppressormutationen konnten bei keinem der photodynamisch behandelten 235-11 c rho^--Stämme nachgewiesen werden. Betrachtet man die Mutantenertragskurven (Abb. 39

und 41), so wird deutlich, daß der LYS-Mutantenertrag bei allen rho⁻-Stämmen in etwa gleich ist. Die maximale Zahl überlebender induzierter LYS-Revertanten findet sich bei allen TP-behandelten Atmungsdefizienten nach 15 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht bzw. im Bereich von einem Letaltreffer. Das gilt auch für die Induktion von ADE-Mutanten, wenn gleich die ADE-Mutantenerträge der einzelnen rho⁻-Stämme um den Faktor 30 - 100 erniedrigt sind.

Stamm 2121-140 rho⁻ zeigt ebenfalls eine durch TP und Licht ausgelöste Mutabilität verschiedener Genloci, wobei sowohl Locus- als auch Suppressormutationen induziert werden (Abbildung 37). Alle getesteten Atmungsdefekte des Elternstammes weisen Mutationen zur Lysin-Prototrophie auf. Die LYS-Kurven der verschiedenen 2121-140 rho⁻-Stämme laufen parallel, wobei die LYS-Rate des spontanen rho⁻-Stammes etwas höher liegt als die der TP-induzierten Atmungsdefekte. Vergleicht man die Mutantenertragskurven (Abb. 40 und 41), so erkennt man, daß der maximale LYS-Mutantenertrag des spontanen etwa 2,5 mal so groß ist als bei den induzierten Atmungsdefizienten. Unterschiede gibt es auch bei den Induktionsmaxima von LYS-Revertanten der verschiedenen rho⁻-Stämme. So kann der spontane rho⁻-Stamm bis zu 15 min Bestrahlung einen realen Zugewinn an induzierten LYS-Mutanten verzeichnen, während bei den TP-induzierten Atmungsdefekten schon nach 5 min Bestrahlung die letale Wirkung des Photosensibilisators die mutagene überlagert, was zu einer Abnahme der induzierten LYS-Mutanten führt. Der spontane Atmungsdefiziente zeichnet sich gegenüber induzierten rho⁻-Stämmen von 2121-140 durch eine gute Mutabilität über einen weiten Dosisbereich aus. Im Unterschied zur photodynamisch behandelten spontanen rho-Mutante weisen die TP-induzierten Atmungsdefekter dieses Stammes wiederum eine Erhöhung der ADE- und ADE/LYS-Mutationsraten auf. Dabei konnte eine durch TP und Licht induzierte und von der Bestrahlungszeit abhängige Erhöhung der Suppressorrate bei beiden induzierten Atmungsdefizienten

(rho^-_{i-10}, rho^-_{i-50}) nachgewiesen werden; die Induktion von ADE-Mutationen hingegen nur bei einem dieser Stämme (rho^-_{i-10}).

Die Locus- und Suppressorraten zeigen einen unterschiedlichen Kurvenanstieg mit andauernder Bestrahlungszeit (Abb. 37, was auf Unterschiede in der photodynamischen Mutationsauslösung hindeutet. Aus der Mutantenertrag-Graphik (Abb. 40) geht hervor, daß zunächst mit großer Effizienz Locusmutanten und mit geringer Effizienz Suppressormutationen induziert werden. Erst nachdem die toxische Wirkung des Photosensibilisators die Locusmutanten zu reduzieren beginnt, erhöht sich die Mutationschance für die Suppressorgene, deren Induktionsmaxima in einem anderen Dosisbereich liegen.

Stamm 2105-15 zeigt ebenfalls eine an den Atmungsdefekt gebundene Erhöhung der Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung mit TP. Dabei werden in spontanen und induzierten Atmungsdefekten gleichermaßen Locus- und Suppressormutationen induziert.

Die Abbildung 38 zeigt für jeden rho^--Stamm und für jede Bedürftigkeit die Locus- bzw. Suppressormutationsraten in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit. Verglichen mit den zuvor beschriebenen Saccharomyces-Stämmen, zeigt der atmungsdefekte rad 2-Stamm eine verhältnismäßig hohe Suppressormutationshäufigkeit. Während bei Stamm 235-11 c rho^- keine und bei Stamm 2121-140 rho^- nur in geringem Maße Suppressormutationen nachgewiesen werden konnten, stellen diese bei Stamm 2105-15 rho^- einen etwa gleich großen Teil induzierter Mutanten wie die Locusmutanten. Aufgrund der Mutantenertragdarstellung in den Abbildungen 42 und 43 werden wiederum Unterschiede in der Mutabilität der einzelnen rho^--Stämme in ihren Induktionsmaxima sichtbar.

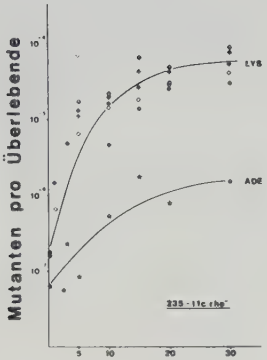
Abb. 36 bis 38.: Einfluß des cytoplasmatischen rho-Faktors auf die Induktion nuklearer Locus- und Suppressormutationen bei den Stämmen 235-11 c rho^-, 2121-140 rho^- und 2105-15 rho^- nach photodynamischer Behandlung mit Thiopyronin.

Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen die Mutationsraten der spontan entstandenen rho^--Stämme (◆—◆ LYS, ✸—✸ ADE, ✚—✚ ADE/LYS), die entsprechenden offenen Symbole stellen die LYSIN-, ADENIN- und ADE LYS-Raten der verschiedenen TP-induzierten rho^--Stämme dar.

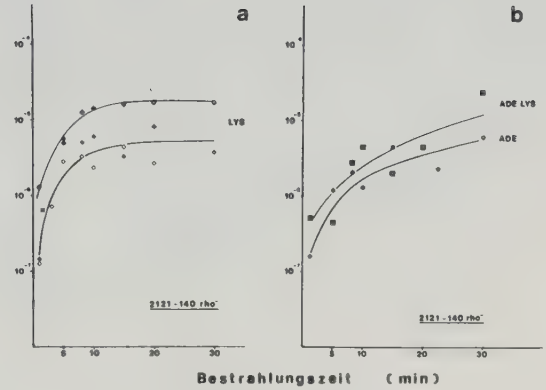
Die Auftragung der Mutationsraten als Mutanten pro Oberlebende erfolgte in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit mit sichtbarem Licht.

Die Symbole der Mutationskurven kennzeichnen jeweils einen experimentell bestimmten Einzelwert.

36


Mutanten pro Überlebende
LYS
ADE
335 - 11c rho⁻

37


a
LYS
2121 - 140 rho⁻
b
ADE LYS
ADE
2121 - 140 rho⁻
Bestrahlungszeit (min)

38

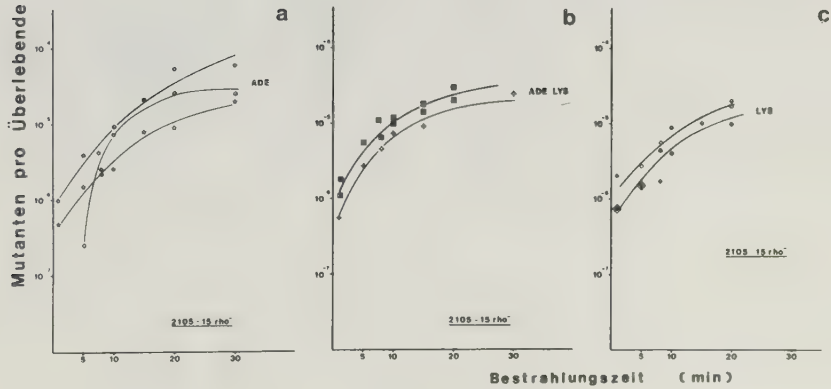
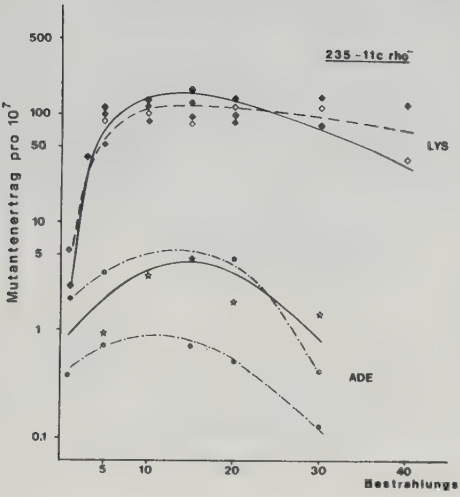

Mutanten pro Überlebende
a
ADE
2105 - 15 rho⁻
b
ADE LYS
2105 - 15 rho⁻
c
LYS
2105 - 15 rho⁻
Bestrahlungszeit (min)

Abb. 39 bis 41.: Durch TP und Licht induzierte nukleare Mutationen zur Adenin- und Lysin-Prototrophie sowie zur Adenin-Lysin-Suppression bei den atmungsdefekten Stämmen 235-11 c rho$^-$ und 2121-140 rho.

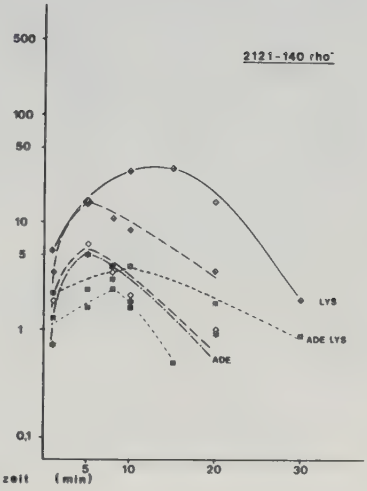
Die Auftragung der Mutationsraten als Mutantenertrag erfolgte einmal in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (Abb. 39 und 40, semilogarithmische Auftragung) und einmal in Abhängigkeit von den letalen Treffern (Abb. 41, doppeltlogarithmische Auftragung).

Es bedeuten geschlossene Symbole und durchgezogene Linien die Mutantenertragskurven der spontanen rho$^-$-Stämme: ◆—◆LYS,✱—✱ADE; offene Symbole und gestrichelte Linien stellen die Kurven der TP-induzierten rho$^-$-Stämme dar. Folgende Symbole kennzeichnen die Mutantenertragskurven der TP-induzierten rho$^-$-Stämme: Stamm 235-11 c rho$^-_{i-5}$:◇—◇LYS,✲—✲ADE; rho$^-_{i-30}$:◈—◈LYS; rho$^-_{i-60}$:◈—◈LYS, ✲—✲ADE (Abb. 39 und 41) und Stamm 2121-140 rho$^-_{i-10}$:◈—◈LYS,✲—✲ADE, ⊠—⊠ADE/LYS; rho$^-_{i-50}$:◈—◈LYS,⊞—⊞ADE/LYS (Abb. 40 und 41).

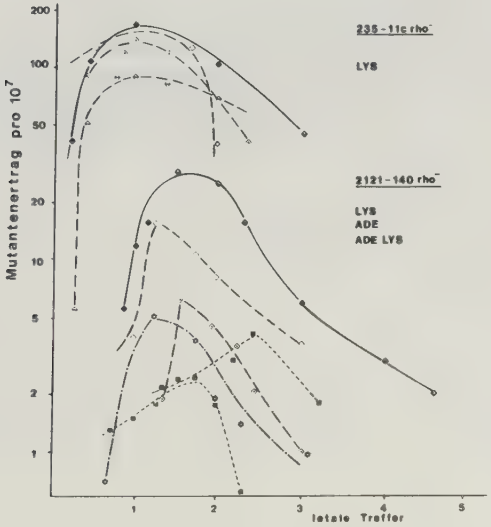
39


235-11c rho⁻
LYS
ADE
Mutantenertrag pro 10⁷
Bestrahlungszeit (min)

40


2121-140 rho⁻
LYS
ADE LYS
ADE

41


235-11c rho⁻
LYS
2121-140 rho⁻
LYS
ADE
ADE LYS
Mutantenertrag pro 10⁷
letale Treffer

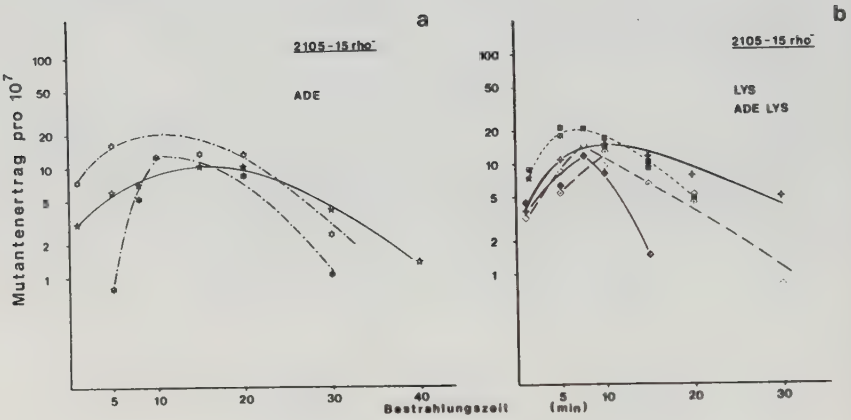


Abb. 42.: Durch photodynamische Behandlung mit TP induzierte ADENIN- und LYSIN-Rückmutationen sowie ADENIN LYSIN-Suppressormutationen bei atmungsdefekten spontanen und TP-induzierten rho⁻-Mutanten des Stammes 2105-15.

Die Auftragung der Mutationsraten als Mutantenertrag erfolgte in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.

Es kennzeichnen geschlossene Symbole und durchgezogene Linien die Mutantenertrags-Kurven der spontanen rho⁻-Stämme; offene Symbole und gestrichelte Linien stellen die Kurven der TP-induzierten rho⁻-Stämme dar.

Es bedeuten: ☆—☆ ADE, ◇--◇ LYS, ⊠--⊠ ADE/LYS bei rho^-_{i-10} und ✡--✡ ADE, ◇—◇ LYS, ⊞—⊞ ADE/LYS bei rho^-_{i-50}.

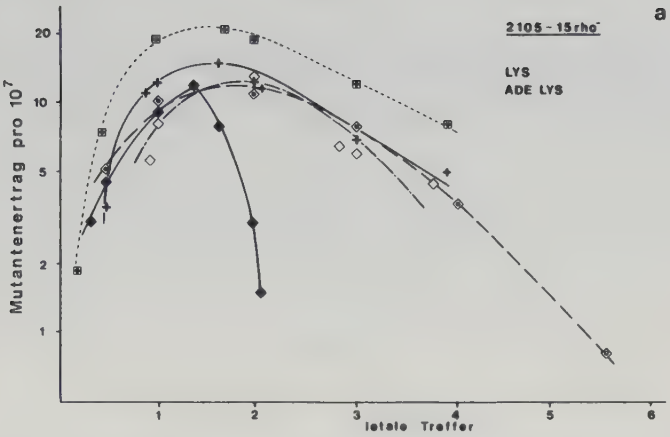
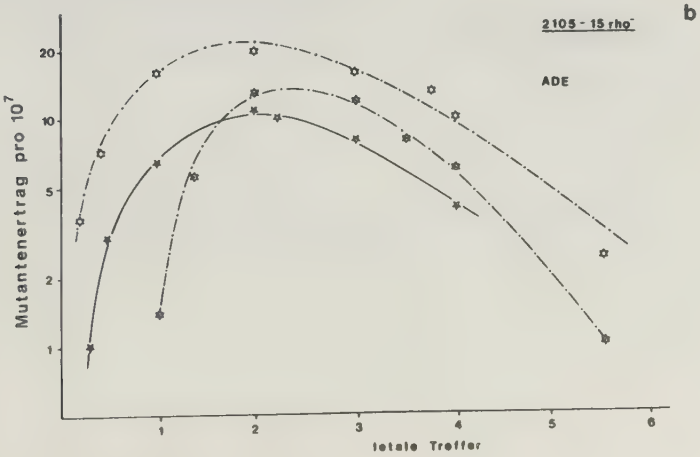


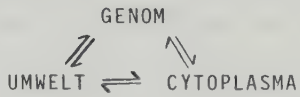
Abb. 43.: PDE-induzierte ADENIN- und LYSIN-Rückmutationen sowie ADENIN LYSIN-Suppressormutationen bei atmungsdefekten spontanen und TP-induzierten rho⁻-Mutanten des Stammes 2105-15 in Abhängigkeit von der letalen Trefferrate.

Es kennzeichnen geschlossene Symbole und durchgezogene Linien die Mutantenertrags-Kurven der spontanen rho⁻-Stämme; offene Symbole und gestrichelte Linien stellen die Kurven der TP-induzierten rho⁻-Stämme dar.



3.5. Umwelt, Cytoplasma, Genom: Ergebnisse der 3-Faktoren-Wirkung auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten

Die vorliegenden Ergebnisse gewinnen an Bedeutung, wenn man sie nicht isoliert betrachtet, sondern versucht, sie in einen sinnvollen Zusammenhang zu stellen, ähnlich dem unten dargestellten Dreieck.



Deshalb sollen folgende aus der Arbeit ersichtliche Zusammenhänge Erwähnung finden:

A) der Einfluß des Genoms bzw. bestimmter Gene auf
   - die Vorkultur-abhängigen photodynamischen Sensibilitätsschwankungen sowie auf
   - die Vorkultur-abhängige cytoplasmatische Mutationsauslösung;

B) der Einfluß des Genoms auf
   - das photodynamische Sensibilitätsverhalten von atmungsdefekten cytogenetischen Mutanten und

C) die Wirkung von
   - Umweltfaktoren und
   - cytogenetischen Faktoren auf das Genom bei der Induktion nuklearer Genmutationen.

Zu A): Die durch verschiedene Umweltbedingungen induzierten Sensibilitätsschwankungen gegenüber dem PDE sind bei den vier untersuchten Saccharomyces-Stämmen unterschiedlich stark ausgebildet und folglich abhängig von deren Genotyp. Dabei treten genetisch bedingte Variationen im Vorkultur-abhängigen photodynamischen Sensibilitätsverhalten nicht nur bei den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM auf, sondern auch bei den bis auf die Strahlensensibilität genetisch gleichen Stämmen 235-11 c RAD, 2121-140 rad 9-4 und 2105-15 rad 2-20. Folglich wirkt bereits eine Genmutation auf das Verhalten eines Stammes unter bestimmten Umweltbedingungen.

Beim Vergleich der in Kapitel 3.2. erhaltenen Versuchsergebnisse wird deutlich, daß von den untersuchten Stämmen Stamm 235-11 c häufig sehr sensibel auf Umwelteinflüsse reagiert. Das gilt sowohl für die Anzucht des Stammes auf Medien mit unterschiedlichen Kohlehydratquellen, als auch für die Glycerinmedium-Anzucht und die Anzucht unter anaeroben Bedingungen.

Eine Mutation im RAD 9-Genbereich wirkt leicht reduzierend auf die Vorkultur-abhängigen photodynamischen Sensibilitätsschwankungen, ebenso in noch höherem Maß eine Mutation im RAD 2-Gen.

Demgegenüber verhält sich Stamm 211-1 aM relativ unempfindlich in Bezug auf veränderte Umweltbedingungen. Sein photodynamisches Sensibilitätsverhalten wird durch die verschiedenen Anzuchtbedingungen nur wenig beeinflußt.

Aus den zuvor beschriebenen Versuchsergebnissen läßt sich folgender Zusammenhang zwischen genetisch bedingten und umweltabhängigen Sensibilitätsschwankungen formulieren:

- Je sensibler sich der Stamm gegenüber dem PDE unter Standardbedingungen verhält, desto geringer ist der Einfluß bestimmter Vorkultur-Variationen auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten des Stammes.

Ebenso deutlich zeigt sich die genotypische Einflußnahme auf die umweltabhängige TP und Licht induzierte cytoplasmatische Mutationsauslösung (siehe Kapitel 3.3.5.). Auch in diesem Fall verhalten sich die reparaturdefekten rad-Mutanten anders als der ihnen zugeordnete isogene strahlenresistente RAD-Wildtyp. Hierin kommt wiederum die Wirkung einzelner Gene auf die Vorkultur-abhängige photodynamische rho$^-$-Induktion zum Ausdruck.

Unterschiede bestehen ebenfalls zwischen den genetisch verschiedenen Stämmen 235-11 c und 211-1 aM, was einem polygenen Einfluß zugeschrieben werden kann (siehe Kapitel 3.4.2.).

In Tabelle 12 wird versucht, die Zusammenhänge einer genetischen und Vorkultur-abhängigen Einflußnahme auf die photodynamische Induktion von atmungsdefekten Mutanten der untersuchten Stämme übersichtlich darzustellen. Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß der Einfluß unterschiedlicher Anzuchtbedingungen auf die TP und Licht induzierte cytoplasmatische Mutationsauslösung beim photodynamisch sensiblen Stamm 211-1 aM äußerst gering ist. Dagegen unterliegt die photodynamische rho$^-$-Induktionsrate des photodynamisch resi-

stenten Stammes 235-11 c erheblichen umweltabhängigen Schwankungen. Diese treten ebenfalls bei den isogenen rad-Stämmen auf, sind allerdings nicht immer identisch und offensichtlich Reparaturgen-spezifisch.

Tabelle 12: Einfluß von Vorkultur und Genom auf die Induktionshäufigkeit von Atmungsdefekten nach photodynamischer Behandlung mit TP. +++ = hohe Induktionsrate; ++ = mittlere Induktionsrate; + = niedrige Induktionsrate; — = keine rho^--Induktion.

	GENOM			
UMWELT	211-1 aM RAD, ilv 2, α	235-11 c RAD, ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1, a	2121-140 rad 9-4 ade 2-1, lys 2-1 his 3, ura 1, α	2105-15 rad 2-20, ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1, α
VM	+++	++	++	++
GM	+++	+++	+	-
AN	+++	-	+++	+

Es läßt sich auch hier ein Zusammenhang zwischen genetisch bedingter und umweltabhängiger photodynamischer rho^--Mutanten-Induktion erkennen:

- Die cytoplasmatische Mutationsauslösung scheint um so weniger durch äußere Bedingungen beeinflußbar, je sensibler sich der Stamm gegenüber dem PDE unter Standardbedingungen verhält.

Zu B): Der Einfluß des Genoms auf die photodynamische Sensibilität von rho^--Mutanten kann umgekehrt ebenso als Einfluß des rho-Faktors auf das genetisch gesteuerte Sensibilitätsverhalten der Stämme nach photodynamischer Behandlung gewertet werden.

Es konnte gezeigt werden, daß Atmungsdefizienz bei den Stämmen 235-11 c und 2121-140 Ursache einer Sensibilitätserhöhung ist, bei den Stämmen 2105-15 und 211-1 aM dagegen zu einem Resistenzgewinn führt (siehe Kapitel 3.3.2., Abb. 10 - 13). Die Einführung des rho-Faktors induziert im vorliegenden Fall bei den genetisch nicht identischen Stämmen 235-11 c und 211-1 aM ein unterschiedliches stammspezifisches Sensibilitätsverhalten. Das bedeutet, daß Atmungsdefizienz nicht notwendigerweise zu einer Sensibilitätserhöhung gegenüber dem PDE führen muß, sondern daß auch bei der cytoplasmatischen rho^--Mutante das nukleare Genom an der Ausprägung des rho^--stammspezifischen photodynamischen Sensibilitätsverhaltens beteiligt ist. Bereits eine Genmutation bewirkt bei den isogenen Stämmen 235-11 c RAD und 2105-15 rad 2-20, daß Atmungsdefizienz der Zelle einen Überlebensvorteil verschafft.

Der Einfluß der rad-Gene macht sich besonders nach photodynamischer Behandlung von spontanen und induzierten Atmungsdefizienten bemerkbar, die ausschließlich bei Vorliegen eines Reparaturgendefekts ein unterschiedliches Sensibilitätsverhalten aufweisen (Kapitel 3.3.3., Abb. 16, 17).

So gesehen, ergeben sich folgende Korrelationen einer gegenseitigen genetisch-cytogenetischen Beeinflussung der photodynamischen Sensibilität. Danach bewirkt die Einführung des rho-Faktors bei den hier untersuchten Stämmen:

- eine Reduzierung der photodynamischen Sensibilität bei photodynamisch sensiblen Stämmen (211-1 aM, 2105-15), wobei der Resistenzgewinn des rho^--Stammes gegenüber photodynamischer Behandlung um so größer ist, je sensibler sich der rho^+-Stamm gegenüber dem PDE unter Standardbedingungen verhält und

- eine Erhöhung der photodynamischen Sensibilität bei photodynamisch resistenten Stämmen (235-11 c, 2121-140), wobei die Sensibilitätserhöhung des rho^--Stammes um so größer ist, je resistenter sich der rho^+-Stamm gegenüber dem PDE unter Standardbedingungen verhält.

Zu C): Der beachtliche Einfluß umweltabhängiger und cytogenetischer Faktoren wird besonders deutlich bei der photodynamisch induzierten nuklearen Mutationsauslösung (siehe Kapitel 3.4.7., 3.4.8.). Während nach Standard-Anzucht der Stämme auf Vollmedium nur wenige Mutationen zur Aminosäure-Prototrophie gesetzt werden konnten, nimmt die Rückmutationsrate nach GM-Anzucht und nach Einführung des rho-Faktors bei den isogenen Stämmen signifikant zu.

Der photodynamisch sensible Stamm 211-1 aM erweist sich auch in dieser Beziehung wiederum als resistent gegen umweltabhängige oder cytogenetische Beeinflussung seines photodynamischen Mutationsverhaltens, das nicht veränderbar ist bzw. nicht induzierbar ist.

Bei den Stämmen 235-11 c, 2121-140 und 2105-15 werden nach Variation der Anzuchtbedingungen und bei Atmungsdefizienz unterschiedliche Locus- und Suppressormutationen gesetzt. Die Mutabilität der einzelnen Codone wird beeinflußt vom Genotyp (RAD, rad 2, rad 9) und von der cytogenetischen Konstitution (rho^--spontan, rho^--induziert).

Tabelle 13 zeigt die Zusammenhänge zwischen genetischer, cytogenetischer und umweltabhängiger Einflußnahme auf die durch TP und Licht induzierten Locus- und Suppressormutationen der isogenen Stämme.

Tabelle 13: Einfluß von Vorkultur, Atmungsdefizienz und Genom auf die Mutierbarkeit einzelner Codone nach photodynamischer Behandlung mit TP.

UMWELT/CYTOPLASMA	G E N O M		
	235-11 c RAD, ade 2-1, lys 2-1, his 3, ura 1, a	2121-140 rad 9-4 ade 2-1, lys 2-1 his 3, ura 1, α	2105-15 rad 2-20 ade 2-1, lys 2-1 his 3, ura 1, α
GM	→LYS	→LYS	→ADE, → ADE/LYS
rho^-_s	→LYS, →ADE	→LYS	→ADE, → LYS,→ →ADE/LYS
rho^-_i	→LYS	→LYS, →ADE→ ADE/LYS	→ADE, → LYS,→ →ADE/LYS

4. DISKUSSION

4.1. Zur Interpretation photodynamischer Versuchsergebnisse

Die photodynamische Behandlung einer Zellpopulation resultiert in dem Absterben eines bestimmten Prozentsatzes photodynamisch letal geschädigter Zellen. Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse besteht jedoch in der Zuordnung von experimentell gewonnenen Versuchsergebnissen zu den diesen Effekt verursachenden molekularen Abläufen. Es ist nicht möglich, eine Aussage über die Art und den Ort der photodynamischen Schädigung innerhalb einer Zelle zu machen, die schließlich zum Zelltod führt. Dieses kann bei mikrobiologischen Untersuchungen nur auf indirektem Wege erfolgen. Eine leichte Modifikation im System der Zelle und die hieraus resultierenden Sensibilitätsänderungen könnten Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Zellkomponente bei der photodynamischen Sensibilisierung geben. Variationen auf zellmorphologischer oder -physiologischer Ebene können durch verschiedene Faktoren wie Umweltfaktoren, cytoplasmatische Faktoren oder genetische Faktoren erzielt werden.

Die Untersuchungen zur photodynamischen Sensibilität von vier Saccharomyces-Stämmen sollten Aufschluß darüber geben, ob und in welchem Maße bestimmte Faktoren das Sensibilitätsverhalten beeinflussen können. Es sollte geprüft werden,

- ob es umweltabhängige Sensibilitätsunterschiede bei einem Stamm gibt,

- ob bestimmte cytoplasmatische Faktoren wie der rho-Faktor einen Einfluß auf das stammspezifische Sensibilitätsverhalten haben und

- ob es signifikante Sensibilitätsunterschiede bei verschiedenen Saccharomyces-Stämmen gibt.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen, die Kenntnisse über das photodynamische Inaktivierungsgeschehen in der Zelle zu vertiefen sowie Hinweise auf den molekularen Wirkort des PDE zu erhalten. Die bisher gewonnenen experimentellen Daten über den photodynamischen Inaktivierungsmechanismus erschweren die Diskussion der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse.

4.1.1. Die photodynamische Inaktivierung biologischer Systeme, eine multifaktorielle Schadenssetzung

Die letale Wirkung des UV-Lichts ist die Folge eines definierten Schadens an definierter Stelle der behandelten Zelle. Aufgrund ihrer Absorptionsmaxima im Bereich kurzwelliger Strahlen sind RNA und DNA UV-absorbierende Chromophoren, und die Bildung von UV-induzierten Pyrimidindimeren ist der am häufigsten gesetzte DNA-Schaden. Die Zahl der Dimere ist abhängig von der Wellenlänge und nimmt proportional zur applizierten Dosis zu (SMITH and HANAWALT, 1969). Es läßt sich ebenfalls die Zahl der Dimere bestimmen, die zum Zelltod führt, z.B. ein Dimer bei total reparaturunfähigen Stämmen (HAYNES et al., 1968).

Ähnliche relativ überschaubare Dosis-Wirkungs-Beziehungen lassen sich für den photodynamischen Inaktivierungsmechanismus nicht formulieren. Die Gründe dafür sind:

a) Gleichzeitig ablaufende photochemische Reaktionen nach dem radikalischen und dem Singlett-Oxigen-Mechanismus,

b) die Vielzahl innerzellulärer Bindungs- und Reaktionsorte für den PDE in Form unterschiedlich sensibler Zellbestandteile.

Bei der Charakterisierung der photodynamischen Zellinaktivierung geht es darum vor allem um die Fragen nach dem ursächlichen Zu-

sammenhang zwischen physiko-chemischen Wirkungsmechanismus eines Farbstoffs und der photodynamischen Zellinaktivierung, und um die Frage, welche Zellbestandteile bevorzugt photodynamisch geschädigt werden.

4.1.1.1. Faktoren, die den photochemischen Reaktionsverlauf steuern

Ob eine farbstoffsensibilisierte photochemische Reaktion nach dem radikalischen oder dem Singlett-Oxigen-Mechanismus abläuft, bestimmen die an der Reaktion beteiligten Komponenten, d.h. der eingesetzte Photosensibilisator sowie das biologische Substrat. Verschiedene Farbstoffe wie Xanthene, Acridine, Thiazine, Porphyrin und Riboflavin reagieren bevorzugt mit molekularem Sauerstoff, wenn er in ausreichender Menge verfügbar ist; andere Sensibilatoren wie z.B. Anthraquinone besitzen eine höhere Reaktivität zu Wasserstoffdonatoren und reagieren als erstes mit einem biologischen Substrat (GROSSWEINER, 1969). Kohlehydrate wie Sorbitol, Cellubiose, Glucose, Alkohole wie das Glycerin und Nukleinsäurebasen werden durch photochemische Reaktionsverläufe nach dem radikalischen Mechanismus photooxidiert (BAUGH et al., 1966; GOLLMICK and BERG, 1968, 1972; BERG et al., 1978; BERG, 1978). Demgegenüber erfolgt der photodynamische Angriff auf Olefine, Furane (Furanosen) und Polysaccharide wie die Cellulose nach dem Singlett-Oxigen-Mechanismus (GOLLNICK and SCHENCK, 1964; GOLLNICK et al., 1970; RABECK and RANBY, 1978).

Daraus ergibt sich, daß in einer photodynamisch behandelten Zelle aufgrund der verschiedenen organischen Moleküle wie Kohlehydrate, Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, photochemische Reaktionen nach Typ I und II parallel ablaufen können, was bewiesenermaßen für Thiopyronin gilt (HOUBA-HERIN et al.,1982).

Außerdem versucht man zu klären, ob es sich bei photodynamisch induzierten Schäden in erster Linie um Primärschäden handelt oder um Sekundärschäden, verursacht durch toxische Zwischenpro-

dukte wie H_2O_2 oder durch die hohe Produktionsrate an reaktiven Singlett-Oxigen. PIETTE und Mitarbeiter (1981) konnten nachweisen, daß die durch Proflavin und Licht induzierten letalen Schäden im viralen Genom hauptsächlich Sekundärschäden waren, verursacht durch Singlett-Oxigen. Die Produktionsrate an Singlett-Oxigen ist außerdem bei verschiedenen Farbstoffen unterschiedlich hoch. So ist Methylenblau ein über dem Durchschnitt liegender Singlett-Oxigen-Produzent, Thiopyronin besitzt eine mittlere Effektivität, während Acridin-Orange keinerlei nachweisbares Singlett-Oxigen produziert (HOUBA-HERIN et al., 1981, 1982). Es zeigte sich auch, daß durch Zugabe oder bei Vorhandensein bestimmter Substanzen die farbstoffsensibilisierte photochemische Reaktion in definierter Weise beeinflußt werden kann (KEARNS, 1971; KNOWLES, 1971 a, b; MATHESON et al., 1975), wodurch gleichzeitig die photodynamische Inaktivierungsrate modifiziert wird. So wirken Stickstoff-Ionen (N_3) als Singlett-Oxigen Quencher, während D_2O (schweres Wasser) die photochemische Reaktion durch Verlängerung des Singlett-Oxigen-Zustands intensiviert (LÜBER and KITTLER, 1976). Inaktivierungsversuche an Hefen konnten das bestätigen (ITO and KOBAYASHI, 1977; ITO, 1978; KOBAYASHI, 1978). Bestimmte Aminosäuren wie Cystein üben einen Schutzeffekt bei der photodynamischen Inaktivierung aus, indem sie den Singlett-Oxigen-Zustand verkürzen (PIETTE et al., 1977); bei Vorhandensein anderer Aminosäuren, z.B. Tryptophan, entsteht beim Einsatz bestimmter Photosensibilisatoren ein synergistischer Effekt, indem die Oxidationsprodukte der Aminosäuren selbst photodynamisch aktiv werden (COX et al., 1982; HALNAK et al., 1983).

Für bestimmte Sensibilatoren ließ sich nachweisen, daß die Bildung von Radikalen während des photochemischen Reaktionsverlaufs unter anaeroben Verhältnissen vollständig gehemmt werden kann (DECUYPER et al., 1982). Freie Radikale wiederum haben vor allem eine zerstörerische Wirkung auf zelluläre Membransysteme wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen und äußere Zellmembran (SLATER and RILEY, 1966).

4.1.1.2. Die Bedeutung der Farbstoff-Substrat-Bindungen für das photodynamische Inaktivierungsgeschehen

Um Informationen über die Wirkung bestimmter Farbstoff-Substrat-Bindungen auf die biologische Funktion einzelner Zellkompenente zu erhalten, untersucht man in vivo und in vitro die farbstoffsensibilisierte Inaktivierung verschiedener Stoffwechselleistungen wie RNS-Synthese, Proteinbiosynthese, Atmung und Gärung. So konnte für TP gezeigt werden, daß sowohl die RNS-Synthese als auch die Proteinbiosynthese durch den Einfluß von TP und Licht in vivo gehemmt werden, wobei sich bei gleicher Behandlung das Protein-synthetisierende System als das sensiblere erweist (LOCHMANN, 1967; LOCHMANN and PIETSCH, 1967; MICHELER, 1972; MICHELER et al., 1973). Zu ähnlichen Ergebnissen kam man bei in vivo Untersuchungen von Atmung und Gärung, bei denen gezeigt werden konnte, daß die Atmung durch photodynamische Behandlung mit TP im Anfangsstadium stärker inaktiviert wird als die Gärung (WATANABE, 1976). Anhand von in vitro-Untersuchungen an zellfreien Systemen konnte man diese Aussagen noch weiter präzisieren. So enthält das zellfreie Protein-synthetisierende System einige Komponenten, die mehr und andere, die weniger sensibel gegenüber photodynamischer Sensibilisierung reagieren. Behandelt man im einzelnen synthetische mRNS (Poly U, Poly C), tRNS oder das ATP-regenerierende System, so hat das keinen nachweisbaren Effekt auf die Proteinsynthese. Eine leichte Herabsetzung der Syntheserate bekommt man erst nach photodynamischer Behandlung der Enzymfraktion, die - wie durch weitere Untersuchungen geklärt wurde- auf eine Inaktivierung der Synthetasen beruht. Eine deutliche Hemmung der Proteinsynthese tritt erst nach photodynamischer Behandlung der Ribosomen und Polyribosomen ein, die somit die empfindlichste Komponente des Protein-synthetisierenden Systems sind (MICHELER, 1972; WATANABE and SCHULZ-HARDER, 1976; LOCHMANN et al., 1981). Diese Ergebnisse zeigen einerseits, daß eine in vitro nachgewiesene TP-Substrat-Bindung eine gute Voraussetzung für die photodynamische Inaktivierung bestimmter Zellkomponenten und der ihnen zugeordneten Systeme schafft, daß aber andererseits nicht in jedem

Fall von einer Farbstoff-Substrat-Bindung auf eine Schädigung des Zellbestandteils in vivo geschlossen werden kann. So konnte trotz der in vitro nachgewiesenen guten Bindungsfähigkeit von TP an native und denaturierte DNS eine Schädigung dieses Systems in vivo nicht beobachtet werden (MICHELER, 1972; LOCHMANN et al., 1976). Auch die Reaktion eines isolierten zellfreien Systems auf photodynamische Behandlung kann sich von der einer in vivo-Untersuchung unterscheiden. WATANABE (1975) konnte nachweisen, daß die O_2-Aufnahme isolierter Mitochondrien und die in vitro-Aktivität von Alkoholdehydrogenase (ADH) nach photodynamischer Behandlung mit TP in wesentlich geringerem Maße inaktiviert wird als Atmung und Gärung in vivo.

4.2. Umweltabhängige Modifikationen der Zellphysiologie als Ursache für photodynamische Sensibilitätsschwankungen

Die photodynamischen Inaktivierungsversuche nach Anzucht der Stämme unter unterschiedlichen Umweltbedingungen haben gezeigt, daß die von außen her modifizierbaren Wachstumsbedingungen in vielen Fällen einen erheblichen Einfluß auf die photodynamische Inaktivierungsrate ausüben. Diese durch äußere Faktoren erzielte Einflußnahme kann sowohl zu einem Resistenzgewinn als auch zu einer Sensibilitätserhöhung des Stammes gegenüber photodynamischer Behandlung mit TP führen. Die Schwankungsbreite dieser umweltabhängigen Empfindlichkeiten ist stammspezifisch. So erfahren die Stämme 235-11 c und 2121-140 nach Anzucht auf einem Lactose-Vorkulturmedium einen starken Resistenzverlust gegenüber photodynamischer Behandlung, während die Stämme 2105-15 und 211-1 aM unter gleichen Anzuchtbedingungen nur eine geringe Sensibilitätserhöhung zeigen (siehe Kapitel 3.2.3., Abb. 4).

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse führen nachfolgend aufgeführte Vorkulturbedingungen bei allen Stämmen zu einem Resistenzverlust gegenüber photodynamischer Behandlung unter Standardbedingungen:

a) Anzucht auf einem niedrig konzentrierten Glucosemedium (Minimal-Glucosemedium 0,25 - 2 %),

b) Anzucht auf einem 2 %igen Lactosemedium,

c) Anzucht auf einem Glycerinmedium.

Demgegenüber erlangen die Stämme einen sichtbaren Resistenzzuwachs durch:

d) Anzucht auf einem 4 %igen Glucosemedium.

Anzucht auf Standard-Vorkulturmedium unter anaeroben Wachstumsbedingungen reduziert die photodynamische Sensibilität bei zwei Stämmen (211-1 aM, 2105-15).

Es stellt sich hierbei die Frage nach dem ursächlichen Zusammenhang zwischen Resistenzverlust bzw. Resistenzgewinn und den entsprechenden Vorkulturbedingungen.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1. erwähnt, wirkt ein niedrig konzentriertes Glucosemedium oder ein nicht fermentierbares Medium wie es das Glycerinmedium darstellt, aktivierend auf das oxidative Atmungssystem der Hefezelle während ihrer logarithmischen Wachstumsphase. Das bedeutet, daß Zellen, die auf einem Minimal-Glucosemedium oder auf einem Glycerinmedium angezogen werden, in beiden Fällen unter sogenannten Derepressionsbedingungen aufwachsen. Das trifft auch bei der Anzucht von Zellen auf 2 %igem Lactosemedium zu. Da das Disaccharid Lactose nach enzymatischer Spaltung je ein Molekül Glucose und ein Molekül Galaktose freisetzt, liegt Glucose in entsprechend niedriger derepressiver Konzentration vor. Gleichzeitig erfüllt Galaktose die Bedingungen einer fermentierbaren nicht repressiven Kohlehydratquelle.

Bei hohem Glucoseangebot decken Hefezellen ihren gesamten Energiebedarf durch die Glykolyse, durch die sich die fakultativ anaeroben Zellen ebenso bei Sauerstoffentzug mit Energie versorgen. Das bedeutet, daß anaerob angezogene Zellen ebenso wie Zellen auf höher konzentriertem Glucosemedium unter Repressionsbedingungen aufwachsen.

Diese Überlegungen lassen im Hinblick auf die vorangegangenen Versuche über den Einfluß verschiedener Vorkulturbedingungen auf die Überlebensrate nach photodynamischer Behandlung den Schluß zu, daß

- Zellen nach Anzucht unter Derepressionsbedingungen eine Sensibilitätszunahme gegenüber dem PDE erfahren und daß demgegenüber

- Zellen nach Anzucht unter Repressionsbedingungen einen Sensibilitätsverlust gegenüber photodynamischer Inaktivierung erlangen.

Repressions- und Derepressionsbedingungen induzieren erwiesenermaßen eine Vielzahl physiologischer und morphologischer Änderungen innerhalb der Zellen, die vor allem den Atmungsapparat betreffen. Mitochondriale Enzyme (membrangebundene sowie lösliche Proteine) liegen während der Repressionsphase in einer inaktiven Form und einer z.T. nicht nachweisbaren Menge vor (POLAKIS and BARTLEY, 1965 a, b; JAYARAMAN et al., 1966; MIAN et al., 1973; PERLMAN and MAHLER, 1974). Die mitochondrialen Cristae sind stark reduziert,und die Anzahl an Mitochondrien pro Zelle ist allgemein verringert worden (STEVENS, 1977). Demgegenüber bewirkt die Derepressionsphase die Aktivierung und Synthese mitochondrialer Atmungsenzyme (PERLMAN and MAHLER, 1974), verbunden mit einer Anreicherung mitochondrialer Cristae und gleichzeitiger Vermehrung der Mitochondrien pro Zelle (STEVENS, 1977).

Mit Zu- und Abnahme der Mitochondrien ändert sich gleichzeitig das Verhältnis zwischen nuklearem und mitochondrialen DNA-Gehalt (BLEEG et al., 1972).

An der Entstehung der umweltabhängigen Sensibilitätsunterschiede nach photodynamischer Behandlung mit TP könnten nachfolgend diskutierte farbstoffsensibilisierte Inaktivierungsmechanismen beteiligt sein:

I.) Reduziert werden könnte die photodynamische Inaktivierungsrate durch vorrangige Bindung der Farbstoffmoleküle an inaktivierte Zellbestandteile wie sie die Mitochondrien unter Repressionsbedingungen darstellen. Die photodynamische Schädigung eines Systems, das die Zelle zum Zeitpunkt der Schädigung und darüber hinaus nicht benötigt, sollte die Überlebensrate nicht weiter beeinflussen. Dagegen muß die photodynamische Inaktivierung eines für die Zelle lebenswichtigen Systems, wie es das oxidative Atmungssystem bei Angebot einer nicht fermentierbaren Kohlehydratquelle darstellt, für die Zelle letal sein.

Diese Argumentationsweise stellt aber gleichzeitig die Forderung nach einer speziellen Versuchsdurchführung, denn der nach diesem Schema arbeitende photodynamische Inaktivierungsmechanismus sollte nur bei Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase unter definierten Wachstumsbedingungen wirksam werden.

Für die Entstehung der vorkulturabhängigen Sensibilitätsschwankungen der hier photodynamisch behandelten Stämme in der stationären Wachstumsphase müssen darum andere Inaktivierungsmechanismen als die zuvor diskutierten zur Wirkung kommen. Umweltabhängige Variationen der innerzellulären Farbstoffkonzentration böten demnach eine andere Möglichkeit der photodynamischen Sensibilitätserhöhung bzw. -erniedrigung. So könnte:

II.) Die innerzelluläre Farbstoffkonzentration durch eine Vervielfältigung bindungskompetenter Zellkomponenten

erhöht oder durch deren Reduktion erniedrigt werden. Dieses könnte einerseits durch eine zahlenmäßige Vermehrung Farbstoff-bindender Zellorganellen geschehen (A) - wie sie die Mitochondrien darstellen -, andererseits durch bestimmte Farbstoffbindung beeinflussende Modifikationen auf molekularer Ebene (B).

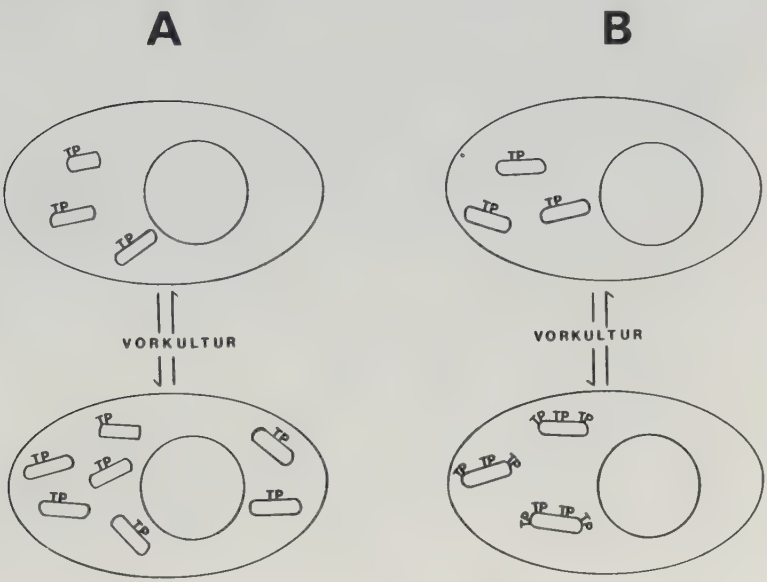


Abb. 44.: Hypothetisches Modell zur Veranschaulichung innerzellulärer Farbstoff-Konzentrations-Unterschiede nach Stamm-Anzucht unter bestimmten Wachstumsbedingungen.

So könnte die Farbstoff-Substrat-Bindung weniger Organellen durch eine vorkulturabhängige geringfügige molekulare Änderung ihrer Membranen, membrangebundener und löslicher Proteine gehemmt oder begünstigt werden. Beispiele für den Einfluß umweltabhängiger innerzellulärer Modifikationen auf molekularer Ebene finden sich mehrfach in der Literatur. So hat die durch definierte Medienzusammensetzung induzierte Änderung in der Lipidkomposition der mitochondrialen Membran Einfluß auf die mitochondriale DNA-Replikation, indem sie die Bindung der mitochondrialen DNA an die mitochondriale Membran verhindert (HALL et al., 1975; BERISH and BLAMIRE, 1977). Versuche zur Induktion von Atmungsdefekten haben gezeigt, daß sich Ethidium-Bromid (EB)-behandelte Stämme nach Anzucht auf einem nicht fermentierbaren Kohlehydratmedium gegenüber der EB-abhängigen rho^--Mutationsauslösung als resistent erweisen. Gleichzeitig konnte bei diesen Stämmen eine stark herabgesetzte Ethidium-Bromid-Bindung an die Mitochondrienmembran sowie an die mitochondriale DNA nachgewiesen werden (GARDELLA and MC QUILLAN, 1977). Ebenso kann die Induktion von Atmungsdefizienten durch EB nach Anzucht des Stammes unter anaeroben Wachstumsbedingungen verhindert werden. Als Grund wird wiederum die Verhinderung der EB-mitochondrialen DNA Komplexbildung aufgrund modifizierter Membranen genannt (BASTOS and MAHLER, 1975; PINTO et al., 1975).

Die Ergebnisse der TP-H^3-Aufnahmeversuche lassen vermuten, daß für die Entstehung der vorkulturabhängigen Sensibilitätsschwankungen nach photodynamischer Behandlung die zuletzt diskutierten Bedingungen zutreffen. Aufgrund der TP-Aufnahmeversuche ließ sich die Richtigkeit einer umweltabhängigen Farbstoffaufnahme bestätigen. Hierbei scheinen die durch unterschiedliche Vorkulturbedingungen induzierten cytoplasmatischen Änderungen für die Aufnahme und Konzentrierung des Farbstoffs in der Zelle von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. So weist die anaerob angezogene Zelle offensichtlich weniger Bindungsstellen für eine

Farbstoffkonzentrierung auf als die bei guter Belüftung auf Standard-Glucosemedium aufgewachsene Zelle wie die TP-Aufnahmekurven der Stämme 235-11 c und 211-1 aM nach Anaerob-Anzucht und Vollmedium-Anzucht beweisen (siehe Kapitel 3.1.6., Abb. 7 und 8). Die Fähigkeit zur Farbstoffkonzentrierung läßt sich - zumindest bei Stamm 235-11 c - durch Anzucht unter derepressiven Wachstumsbedingungen noch einmal deutlich steigern wie die TP-H^3-Aufnahmekurven nach Glycerinmedium-Anzucht zeigen.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse kann auf eine Beteiligung innerzellulärer Membransysteme am photodynamischen Inaktivierungsgeschehen geschlossen werden. Ob hierbei die Membranen das eigentliche sensible System darstellen, dessen Inaktivierung oder selektive Zerstörung zum Zelltod führt, oder ob sie durch Konzentrierung des Farbstoffs optimale Bedingungen für eine farbstoffsensibilisierte Zellinaktivierung schaffen, kann nicht entschieden werden. Denkbar wäre beides. So haben Versuche an Säuger-Zellkulturen gezeigt, daß die eingesetzten Farbstoffe besonders in den Lysosomen gespeichert werden. Die photodynamische Zerstörung der Lysosomenmembran und die daran anschließende Ausschüttung lysosomaler Enzyme ins Cytoplasma führt schließlich zum Zelltod (SLATER and RILEY, 1966; ALLISON et al., 1966).

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß die photodynamische Hemmung der Proteinbiosynthese mit TP die Folge einer reduzierten Ribosomensynthese aufgrund einer Hemmung des cytoplasmatischen RNA-Metabolismus ist (LOCHMANN et al., 1981). Da die Proteinsynthese an membrangebundenen Ribosomen stattfindet (LOCHMANN et al., 1980, 1981), ist es denkbar, daß bei einer durch Farbstoff besetzten oder photodynamisch geschädigten Membran die Proteinbiosynthese stark beeinträchtigt wird.

4.3. Cytogenetische Faktoren, die das photodynamische Sensibilitätsverhalten beeinflussen

Die photodynamischen Inaktivierungsversuche an Stämmen mit funktionsfähigen Atmungssystem sowie an atmungsdefekten Mutanten sollten klären, in welchem Maße cytogenetische Faktoren das stammspezifische photodynamische Sensibilitätsverhalten beeinflussen. Die Mitochondrien erscheinen als ein geeignetes System, um den Einfluß und die Beteiligung definierter cytoplasmatischer Zellbestandteile an der photodynamischen Zellinaktivierung zu überprüfen, denn Funktionsfähigkeit oder Schädigung dieses Systems lassen sich auf einfache Art durch Überprüfung des zellulären Atmungsvermögens feststellen. Da die Schädigung nicht letal ist, bietet sich hier gleichzeitig eine Gelegenheit zu einem photodynamischen Sensibilitätsvergleich zwischen Zellen mit intaktem und Zellen mit defektem Atmungsapparat. Ein weiterer Vorteil liegt in der direkten Kontrollierbarkeit der photodynamischen Schädigung der Organellen durch Bestimmung induzierter cytoplasmatischer rho^--Mutationen.

Die in Kapitel 3.3. beschriebenen Ergebnisse bilden einen Beweis für die Abhängigkeit des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens eines Stammes von bestimmten cytogenetischen Faktoren, die die Atmungsfähigkeit einer Zelle kontrollieren. Entgegen bisherigen Forschungsergebnissen, wonach Atmungsdefiziente stets eine höhere Sensibilität gegenüber dem Photosensibilisator TP oder auch anderen inaktivierenden Agenzien aufweisen als der atmungskompetente Elter (WATANABE, 1976; ROTH et al., 1978; POLAKOWSKA and PUTRAMENT, 1981; KOLTOVAYA and DEVIN, 1982), konnte hier gezeigt werden, daß Atmungsdefizienz aufgrund einer spontan entstandenen oder induzierten cytoplasmatischen rho^--Mutation sowohl zu einem Resistenzgewinn als auch zu einer Sensibilitätserhöhung bei den photodynamisch behandelten Stämmen führen kann.

Folgende stammspezifische Verhaltensweisen konnten beobachtet werden:

- Eine Sensibilitätserhöhung bei spontanen Atmungsdefekten der Stämme 235-11 c und 2121-140,

- eine Sensibilitätserhöhung bei induzierten Atmungsdefekten der Stämme 235-11 c, 2121-140 und 2105-15,

- ein Resistenzgewinn gegenüber photodynamischer Behandlung bei spontanen Atmungsdefekten der Stämme 211-1 aM und 2105-15,

- ein Resistenzgewinn bei induzierten Atmungsdefekten des Stammes 211-1 aM.

Das besondere Interesse gilt hierbei vor allem I. dem photodynamischen Sensibilitätsverhalten der Stämme 211-1 aM rho$^-$ und 235-11 c rho$^-$ sowie II. der unterschiedlichen photodynamischen Sensibilisierbarkeit der spontanen und induzierten rho$^-$-Mutanten der Stämme 2121-140 und 2105-15.

Ein gemeinsames Charakteristikum betrifft den Dosis-Effekt-Kurvenverlauf der photodynamisch behandelten spontanen rho$^-$-Mutanten der Stämme 211-1 aM, 235-11 c und 2121-140. Im Gegensatz zu den DEK der atmungskompetenten Elternstämme zeichnen sich die DEK der rho$^-$-Mutanten durch einen mehr oder weniger ausgeprägten Schulterbereich aus, der sowohl bei dem Stamm mit photodynamischen Resistenzgewinn (211-1 aM rho$^-$) als auch bei den Stämmen mit Sensibilitätserhöhung (235-11 c rho$^-$ und 2121-140 rho$^-$) auftritt.

Da Schulterkurven einen Beweis für die Herabsetzung letaler Schäden im niederen Dosisbereich bilden, stellt sich die Frage nach dem Wirkmechanismus dieser cytoplasmatischen Einflußnahme. Eine Reduktion photodynamischer Schäden durch einen nur in rho$^-$-Zellen wirksamen Reparaturmechanismus scheint unwahrscheinlich. Denkbar wäre dagegen die Reduzierung der photo-

dynamisch wirksamen Farbstoffmenge innerhalb der Zelle durch bevorzugte Bindung der Farbstoffmoleküle an schädigungsfreie Zellbestandteile wie sie die Mitochondrien in atmungsdefekten Zellen darstellen. Erst über einen längeren Bestrahlungszeitraum werden dann in zunehmendem Maße auch andere für die Zelle lebenswichtige Bestandteile photodynamisch geschädigt, was zu einem schnellen Absinken der Überlebensrate in diesem Dosisbereich führt.

Diese Hypothese kann ebenfalls zur Diskussion des unterschiedlichen Sensibilitätsverhaltens der spontanen und induzierten rho^--Stämme von 211-1 aM und 235-11 c herangezogen werden. Wenn durch die Aufnahme des Photosensibilisators in die Mitochondrien der atmungsdefekten Zellen die photodynamisch wirksame Farbstoffmenge reduziert wird, könnte das Sensibilitätsverhalten von rho^--Stämmen auf unterschiedliche Weise beeinflußt werden.

I. a) Variation der Mitochondrienzahl pro Zelle

Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle ist stammspezifisch und hängt ab von der Energieumsatzrate des betreffenden Stammes. Schnell wachsende Kulturen haben während der logarithmischen Wachstumsphase relativ wenig Mitochondrien, während sie in der stationären Phase sehr viele Mitochondrien besitzen (BLEEG et al., 1972; STEVENS, 1974, 1977). Diese Bedingungen sollten für Stamm 211-1 aM gelten. Aufgrund seiner höheren Wachstumsgeschwindigkeit (siehe Abb. 23) ist anzunehmen, daß der Wildtyp seinen Energiebedarf hauptsächlich aus dem aeroben Atmungsstoffwechsel deckt und demzufolge besonders während der stationären Wachstumsphase über eine große Anzahl an Mitochondrien verfügt. Die photodynamische Behandlung des atmungskompetenten Stammes könnte infolge einer massiven Schädigung des photodynamisch sensiblen Atmungsstoffwechsels (WATANABE, 1976) zum Zusammenbruch des gesamten atmungsenergieversorgenden Systems führen.

Dagegen ist das Gärungssystem der anaerob wachsenden atmungsdefizienten rho^--Zellen wenig sensibel gegenüber photodynamischer Behandlung (WATANABE, 1976). Zusätzlich könnte die photodynamische Inaktivierung durch eine innerzelluläre Speicherung des Farbstoffs in den zahlreich vorhandenen aber funktionslosen Mitochondrien herabgesetzt werden, wodurch alle atmungsdefekten Mutanten des Stammes 211-1 aM einen beachtlichen photodynamischen Resistenzgewinn gegenüber dem Wildtyp erhalten.

Bei gleicher TP-Aufnahmekapazität eines Mitochondriums sollte die Menge des mitochondrial gespeicherten Farbstoffs von der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle abhängen. Das würde bedeuten, daß die photodynamische Sensibilität der rho^--Zelle mit zunehmender Anzahl an Mitochondrien abnimmt. Dieses könnte der Grund für die geringen Sensibilitätsunterschiede zwischen den verschiedenen isolierten spontanen und induzierten Atmungsdefekten des Stammes 211-1 aM sein.

Stamm 235-11 c zeichnet sich gegenüber Stamm 211-1 aM durch eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit aus, ein Hinweis auf eine geringere Energieumsatzrate. Hierin könnte ein Grund seiner allgemeinen photodynamischen Resistenz liegen. Schließlich sollte infolge seines geringeren Energiebedarfs die Zahl der Mitochondrien pro Zelle verringert sein. Das wiederum könnte bedeuten, daß bei der photodynamischen Behandlung von atmungsdefekten rho^--Mutanten dieses Stammes der Resistenzgewinn durch einen mitochondrialen Konzentrierungseffekt gering ist. Allerdings unterscheiden sich der photodynamisch behandelte rho^+-Elternstamm und die rho^--Mutante in ihrer Sensibilität im niederen Dosisbereich nicht voneinander. Erst im höheren Dosisbereich zeichnen sich die Atmungsdefekten durch eine höhere photodynamische Empfindlichkeit aus. Offensichtlich reicht der geringe Energiegehalt der Anaeroben auf die Dauer nicht aus, die lebenserhaltenden Stoffwechselsysteme nach photodynamischer Behandlung aufrechtzuerhalten.

aa) Bindung von Thiopyronin an mitochondriale Bestandteile

Das Eindringen des Farbstoffs in die Mitochondrien sollte bis zum Erreichen eines Diffusionsgleichgewichts erfolgen, d.h. bis die innermitochondriale Farbstoffkonzentration der cytoplasmatischen (extramitochondrialen) Farbstoffkonzentration entspricht, es sei denn, mitochondriale Permeabilitätsbarrieren würden die Diffusion unterbinden oder der Farbstoffaufnahme würde gegen den Konzentrationsgradienten weiter gesteigert werden. Eine Anreicherung des Farbstoffs in den Mitochondrien wäre durch seine Bindung an mitochondriale Bestandteile wie mitochondriale DNA, mitochondriale Ribosomen u.a. möglich.

SCHÖTZE (1982) konnte nachweisen, daß ca. 7 % des von der Zelle aufgenommenen Farbstoffs von den Mitochondrien gebunden wird und daß hiervon wiederum ein Teil (0,652 %) an die mitochondriale DNA gebunden auftritt. Das entspricht einem gebundenen TP-Molekül pro 53 Nukleotide der mitochondrialen DNA. Das würde bedeuten, daß die Menge mitochondrialer DNA-gebundenen Farbstoffs von der Anzahl mitochondrialer DNA Moleküle abhängt. Da das Verhältnis zwischen mitochondrialem Genom zu Mitochondrienzahl pro Zelle immer konstant ist (BLEEG et al., 1972), wird der mitochondriale DNA-Gehalt der Zelle von der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle bestimmt. Demnach müßte der sich schnell vermehrende Stamm 211-1 aM insgesamt mehr mitochondriale DNA pro Zelle besitzen als Stamm 235-11 c. Dieses sollte sich vorteilhaft auf eine mitochondriale Bindung und Konzentrierung des Farbstoffs auswirken, wodurch ein höherer Prozentsatz des in die Zellen von 211-1 aM eingedrungenen Farbstoffs von den Mitochondrien gespeichert werden könnte. Allerdings konnten elektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme 211-1 aM und 235-11 c keine quantitativen Unterschiede im Mitochondriengehalt der Zellen aufzeigen (WECKE, persönliche Mitteilung).

Ein indirekter Beweis für die Bindung des Farbstoffs an mitochondriale DNA ist die photodynamische Induktion von cytoplasmatischen rho^--Mutationen aufgrund einer Schädigung des mitochondrialen Genoms.

Durch die in Kapitel 3.3.4. beschriebenen Versuche zur TP-Induktion von Atmungsdefekten konnte bewiesen werden, daß der Photosensibilisator in die Mitochondrien der Zellen eindringt und nach Absorption von Strahlung aus dem sichtbaren Bereich bei den untersuchten Stämmen Mutationen zur Atmungsdefizienz induziert. Die unterschiedliche Sensibilität der Stämme gegenüber cytoplasmatischer rho-Induktion könnte zum einen die Folge einer unterschiedlich starken Bindung des Farbstoffs an die Organellen sein. Bei einer verminderten Bindung des Photosensibilisators an die äußere Mitochondrienmembran sollte auch die Penetration von TP in die Organelle reduziert werden. Zum anderen könnten die stammspezifischen Mitochondrien bei gleichen Bindungseigenschaften unterschiedliche Membranpermeabilitäten für den Farbstoff aufweisen. In beiden Fällen sollte der intramitochondriale Farbstoffgehalt variieren. Ist die mitochondriale DNA Bindungsort für TP, könnte auf diese Weise die rho-Induktion beeinflußt werden.

b) Membranpermeabilität der Mitochondrien für Thiopyronin

Eine andere Ursache des unterschiedlichen Sensibilitätsverhaltens der atmungsdefekten Stämme von 211-1 aM und 235-11 c könnte in der stammspezifischen mitochondrialen Membranpermeabilität für den inaktivierenden Farbstoff begründet liegen. Theoretisch könnten mitochondriale Membranfunktionsunterschiede bei den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM zu einer unterschiedlichen Konzentrierung des Farbstoffs in den Mitochondrien führen, was die nachfolgend diskutierten Auswirkungen auf das Sensibilitätsverhalten der photodynamisch behandelten atmungskompetenten und atmungsdefizienten Zellen beider Stämme haben könnte.

Eine mitochondriale Permeabilitätsschranke bei Stamm 235-11 c, die das Eindringen des Farbstoffs in die Zellorganellen verhindert bzw. verringert, wodurch das photodynamisch sensible aerobe Stoffwechselsystem geschützt wird, sollte der rho^+-Zelle einen gewissen Überlebensvorteil bei der farbstoffsensibilisierten Inaktivierung gewähren. Atmungsdefekte Zellen des gleichen Stammes können hiervon nicht profitieren. Denkbar ist, daß bei den rho^--Mutanten ebenso wie bei den rho^+-Zellen der in die Zellen diffundierte Farbstoff als erstes an die äußere Mitochondrienmembran reversibel gebunden wird, bis alle Bindungsstellen abgesättigt sind. Nur eine geringe Menge gelangt in die Organelle, wodurch das aerobe Stoffwechselsystem der rho^+-Zellen photodynamisch geschädigt wird, während das funktionslose Mitochondrium in rho^--Zellen lediglich eine Farbstoffspeicherfunktion ausübt. In diesem Stadium photodynamischer Behandlung zeichnet sich die atmungsdefekte Mutante durch eine gewisse photodynamische Resistenz aus, was sich in der Schulterbildung der DEK Atmungsdefekter bemerkbar macht. Im weiteren Inaktivierungsverlauf kann der an die Mitochondrienmembran reversibel gebundene Farbstoff auch andere Zellbestandteile schädigen. Hier besitzt die rho^+-Zelle einen Überlebensvorteil, der aller Wahrscheinlichkeit nach aus ihrer besseren Energieversorgung resultiert.

Stamm 211-1 aM könnte aufgrund des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens seiner atmungskompetenten und atmungsdefizienten Zellen mitochondriale Membraneigenschaften besitzen, die das ungehinderte oder erleichterte Eindringen des Photosensibilisators in die Zellorganelle sowie seine dortige Konzentrierung erlauben. Dieses sollte bei Atmungsaktiven zu einer schnellen Schädigung des aeroben Atmungsstoffwechsels führen, während bei Atmungsdefizienten die photodynamisch wirksame Farbstoffmenge durch die innermitochondriale Speicherung reduziert wird, ein Effekt, der den rho^--Zellen einen beachtlichen Resistenzgewinn verschafft.

Die Versuche zur Induktion cytoplasmatischer rho⁻-Mutationen könnten die oben diskutierten Thesen stammspezifischer innermitochondrialer Farbstoffkonzentrationsunterschiede unterstützen.

Bei vergleichenden Versuchen zur induzierenden Wirkung mehrerer Substanzen stellte man Unterschiede zwischen den in vitro und in vivo Ergebnissen fest. Während die Blockierung der mitochondrialen DNA-Synthese durch Proflavin und Euflavin in vitro gleich war, erwies sich Euflavin bei der in vivo Synthesehemmung als das effektivere Agenz, was man auf eine mitochondriale Permeabilitätsbarriere für Proflavin zurückführte (MATTICK and NAGLEY, 1977).

Wie aus den rho⁻-Induktionskinetiken der Stämme in Abbildung 17 zu ersehen ist, zeigt Stamm 211-1 aM in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit die höchste Mutationsrate, während die weitgehend isogenen Stämme 235-11 c, 2121-140 und 2105-15 diesbezüglich alle niedrigere Werte zeigen. Unter der Voraussetzung, daß bei gleicher Behandlung der Stämme die Effektivität der photodynamischen Mutationsauslösung von der Menge der an die mitochondriale DNA gebundenen Farbstoffmoleküle abhängt, sollte aufgrund dieser Ergebnisse Stamm 211-1 aM die höhere mitochondriale Farbstoffkonzentration aufweisen und die Stämme 235-11 c, 2121-140 sowie 2105-15 eine dementsprechend geringere TP-Konzentration.

BASTOS und MAHLER (1974) konnten für das rho⁻-Mutationen induzierende Agenz Ethidium Bromid nachweisen, daß Stämme, die gegenüber Ethidium Bromid-Mutagenese resistent sind, eine herabgesetzte Fähigkeit zur EB-mtDNA-Bindung zeigen.

II. a) Unterschiede im mitochondrialen Genom

Eine weitere cytogenetische Einflußnahme auf die Sensibilisierbarkeit von Saccharomyces-Zellen nach photodynamischer Behandlung mit TP liegt bei den spontanen und induzierten Atmungsdefekten der Stämme 2105-15 und 2121-140 vor. Bei den rad-Stämmen zeichnen sich die TP-induzierten Atmungsdefekte durch eine erhöhte Sensibilität gegenüber den spontanen Atmungsdefekten aus. Dieser Unterschied könnte im mitochondrialen Genom der spontanen und induzierten Atmungsdefizienten begründet liegen.

Spontane rho^--Mutanten entstehen durch das Herausschneiden mitochondrialer DNA-Segmente aus dem Wildtyp-Genom infolge eines illegitimen seitenspezifischen Rekombinationsprozesses und die anschließende Vervielfältigung dieser Sequenzen (BERNARDI, 1979). Die Ursache der häufig spontan auftretenden rho^--Mutation ist der hohe Anteil homologer, repititiver, nicht codierender DNA-Sequenzen wie AT-Spacer und GC-Cluster (BERNARDI, 1979; FAUGERON-FONTY et al., 1979; BALDACCI et al., 1980; BERNARDI and BERNARDI, 1980). Diese machen etwa 50 % des mitochondrialen Wildtyp-Genoms aus (PRUNELL and BERNARDI, 1974, 1977). Genome spontaner Atmungsdefekter enthalten oft kein Gen außer einem Initiationslocus zur Replikation (Ori-Segment), wodurch die Vermehrung des cytoplasmatischen Genoms gewährleistet bleibt (BERNARDI, 1979; ZAMAROCZY et al., 1981; BERNARDI, 1982).

Anders verläuft der Substanz-abhängige rho^--Induktionsmechanismus. Induzierende Substanzen wie z.B. Ethidium-Bromid (EB), ein Phenanthren-Farbstoff, gehen zunächst mit Teilen der mitochondrialen DNA eine Bindung ein (MAHLER and BASTOS, 1974; BASTOS and MAHLER, 1974), wodurch es einerseits zur Hemmung der mitochondrialen DNA-Synthese kommen kann, andererseits zu einer Fragmentierung der mitochondrialen DNA infolge eines enzymgesteuerten Abbaus der DNA-(EB)-Komplexe (GOLDRING et al., 1970; PERLMAN and MAHLER, 1971; MAHLER and BASTOS, 1974). Die Behandlung kann zum gleichmäßigen Verlust mitochondrialer, genetischer Marker führen - wie bei EB - oder auch zum Verlust

bestimmter mitochondrialer Gen-Sequenzen wie bei 3-Carbethoxi-Psoralen, einem Furocoumarin (JULIANI et al., 1976). Der mitochondriale DNA-Gehalt der induzierten Atmungsdefekte schwankt je nach Substanzkonzentration und Expositionszeit zwischen 0 und 16 % im Vergleich zur Kern-DNA (NAGLEY and LINNANE, 1970, 1972).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Forschungsergebnisse sollte man voraussetzen können, daß sich die farbstoffinduzierten rho$^-$-Mutanten der hier untersuchten Stämme in ihrem mitochondrialen Genom sowohl voneinander als auch von den spontanen Atmungsdefekten unterscheiden. Die einzelnen rho$^-$-Stämme könnten Variationen in der mitochondrialen DNA-Sequenz sowie im mitochondrialen DNA-Gehalt aufweisen. So sollte sich das mitochondriale Genom spontaner rho$^-$-Mutanten durch eine gewisse Einheitlichkeit auszeichnen, da vornehmlich ganz bestimmte mitochondriale Genregionen herausgeschnitten (HEUDE et al., 1979) und vervielfältigt werden. Demgegenüber sollte bei den TP-induzierten Atmungsdefekten je nach Dauer der vorangegangenen photodynamischen Behandlung eine mehr oder weniger große Anzahl der mitochondrialen DNA-Sequenzen durch enzymatischen Abbau aus dem mitochondrialen Genom entfernt worden sein, wodurch sich gleichzeitig der mitochondriale DNA-Gehalt der Zellen in unterschiedlicher Weise reduzieren würde. Der Abbau mitochondrialer DNA nach photodynamischer Behandlung erscheint als Folge der zahlreichen TP-induzierten Einzelstrangbrüche (SCHOTZE, 1982) als sehr wahrscheinlich.

Werden diese rho$^-$-Stämme anschließend einer photodynamischen Behandlung unterzogen, so könnte das bei einer Bindung des Farbstoffs an die mitochondriale DNA zu unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen in den Mitochondrien der verschiedenen rho$^-$-Mutanten führen, eine schon zuvor diskutierte Ursache für unterschiedliches photodynamisches Sensibilitätsverhalten von Atmungsdefekten. Bezogen auf die hier vorliegenden Versuchsergebnisse würde das bedeuten, daß die TP-induzierten

rho$^-$-Mutanten der rad-Stämme im allgemeinen weniger mitochondriale TP-Bindungsstellen wie die mitocohondriale DNA aufweisen sollten als die spontan entstandenen. Infolge des daraus resultierenden, hypothetisch postulierten, vermehrten Angriffs freier Farbstoffmoleküle auf andere zelluläre Systeme, weisen die induzierten Atmungsdefekte im Vergleich zu den spontanen eine erhöhte Sensibilität gegenüber photodynamischer Behandlung auf.

Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei der Behandlung von verschiedenen rho$^-$-Stämmen mit bestimmten induzierenden und inaktivierenden Substanzen. Die von NAGLEY und MATTICK (1977) beobachteten Resistenzunterschiede bei einzelnen rho$^-$-Stämmen gegenüber den gleichen Drogen, führten die Autoren auf das Vorhandensein unterschiedlicher mitochondrialer DNA-Sequenzen in den Stämmen zurück. Gleichzeitig konnte man nachweisen, daß die Sensibilität für salpetrige Säure bei den behandelten atmungskompetenten und atmungsdefizienten Zellen in definierter Weise vom mitochondrialen Mutationstyp bestimmt wird, und zwar nimmt die Sensibilität wie folgt ab: rho^0 > rho$^-$ > mit$^-$ > rho$^+$ (DEVIN and KOLTOVAYA, 1981, KOLTOVAYA and DEVIN, 1982). Es weisen die durch den Verlust ihrer gesamten mitochondrialen DNA gekennzeichneten rho^0-Mutanten (sogenannte neutrale Atmungsdefekte) die höchste Sensibilität auf, gefolgt von den rho$^-$-Deletionsmutanten mit unterschiedlichem mitochondrialen DNA-Gehalt und den mit$^-$-Mutanten, die sich vom rho$^+$-Wildtyp nur durch eine mitochondriale Genmutation (Punktmutation) unterscheiden, jedoch den gleichen mitochondrialen DNA-Gehalt wie diese besitzen.

4.4. Kontrollieren nukleare Gene das photodynamische Sensibilitätsverhalten?

Die hier untersuchten Stämme zeigen ein unterschiedliches photodynamisches Sensibilitätsverhalten bei standardisierten Versuchsbedingungen (Abb. 24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin,

daß dem nuklearen Genom eine nicht unerhebliche Beteiligung bei der Kontrolle der photodynamischen Inaktivierung und Sensibilisierung zukommt, wobei sich die Frage nach der genetisch determinierten Ursache stellt. Theoretisch kann die vom Kern gesteuerte Einflußnahme auf unterschiedliche Weise realisiert werden. So z.B. durch die direkte nukleare Beeinflussung des photodynamischen Inaktivierungsgeschehens auf der Ebene des physiko-chemischen Reaktionsverlaufs oder indirekt durch die nukleare Bereitstellung bestimmter Genprodukte, die an der Reparatur bereits manifestierter photodynamischer Schäden beteiligt sind. Bei den hier behandelten Stämmen stehen beide Möglichkeiten der genotypischen Beeinflussung zur Diskussion.

Das Interesse gilt einmal dem großen Sensibilitätsunterschied zwischen den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM sowie den relativ kleineren Sensibilitätsunterschieden zwischen den reparaturdefekten rad-Stämmen 2121-140 rad 9-4 und 2105-15 rad 2-20 und dem Wildtyp 235-11 c RAD.

4.4.1. Photodynamische Sensibilitätsunterschiede zwischen den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM

Die in Kapitel 3.4.4. durchgeführten genetischen Analysen deuten auf sensibilitätsverursachende Genmutationen mit dominantem mendelnden Erbgang hin wie es das Sensibilitätsverhalten des photodynamisch behandelten Diplonten und der isolierten Haplonten beweist (Abb. 27 und 28).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wissenschaftler, die sich ebenfalls mit dem Problem der Vererbung photodynamischer Sensibilität beschäftigt hatten. So erbrachte die Kreuzung induzierter und spontan entstandener TP-sensibler bzw. resistenter Saccharomyces-Stämme mit einem normal sensiblen Wildtyp und eine anschließend durchgeführte Tetradenanalyse in den meisten Fällen eine meldelnde Aufspaltung von 2 : 2, und zwar 2 photo-

dynamisch sensible (PDS) und 2 normale Sporen nach der Kreuzung PDS X WT sowie 2 photodynamisch resistente (PDR) und 2 normale Sporen nach der Kreuzung PDR X WT (ROTH et al., 1978). Weitere Untersuchungen zur TP-Sensibilitätsvererbung führten zur Identifizierung von vier verschiedenen Genen (thp^{R_1} - thp^{R_4}), die in mutiertem Zustand Resistenz gegenüber dem fungiziden, d.h. wachstumshemmenden Dunkeleffekt von TP verursachen. Drei der betreffenden Gene haben keinen Einfluß auf die photodynamische Inaktivierung, während das vierte Gen gleichzeitig an der Kontrolle des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens beteiligt ist (ANDERSON and ROTH, 1983). Das den Genen zugeordnete TP-Sensibilität bzw. Resistenz-verursachende unbekannte Genprodukt ist sowohl in den zuvor zitierten Arbeiten als auch in der vorliegenden Dissertation Gegenstand der Diskussion.

Einen sensibilitätsmodifizierenden Effekt könnte die Mutation in einem Regulatorgenbereich für die Synthese bestimmter Substanzen haben, bei deren Konzentrationszunahme ein zellulärer Schutzmechanismus gegen die photodynamische Inaktivierung in Gang gesetzt wird. So kann z.B. die photodynamische Phageninaktivierung nach Zugabe von Cystein und anderen schwefelhaltigen Substanzen um 30 % gesenkt werden (PIETTE et al., 1977).

Denkbar wäre ebenfalls eine Mutation in einem Strukturgenbereich, der beispielsweise für bestimmte Membranproteine wie Strukturproteine, Porenproteine oder membrangebundene Enzyme codiert. Auf diese Weise könnten in der äußeren Zellmembran, der Mitochondrienmembran oder der Kernmembran Permeabilitätsschranken für den inaktivierenden Farbstoff auf- oder abgebaut werden, woraus eine unterschiedliche Farbstoffaufnahme und Schadenssetzung für Wildtyp und Mutante entstehen würde. Auch ANDERSON und ROTH (1983) diskutieren die Möglichkeit einer durch Mutation reduzierten zellulären Farbstoffaufnahme und/oder Farbstoffbindung als Ursache einer genetisch determinierten TP-Resistenz.

Hinweise auf die Auswirkungen von physiologischen Veränderungen an Plasma- und/oder Mitochondrienmembranen finden sich in mehreren Veröffentlichungen. So können Permabilitätsbarrieren an der äußeren oder der mitochondrialen Membran, die auf eine einzige Genmutation zurückzuführen sind, eine Resistenz für verschiedene Antibiotika gleichzeitig (multiple Drogenresistenz) oder selektiv für bestimmte Substanzen bewirken und auch eine Hemmung der Induktion Atmungsdefekter verursachen (RANK et al., 1975; RANK et al., 1976; RANK et al., 1977; MATTICK and NAGLEY, 1977). Andererseits können physiologische Permeabilitätsschranken durch Mutation verloren gehen, so daß der davon betroffene Stamm auf bestimmte Behandlungen sensibel reagiert (PUGSLEY et al., 1980). So hängt auch die photodynamische Phageninaktivierung von der Permabilität der Hüllproteine ab, die bei den einzelnen Stämmen unterschiedlich sein kann (RITCHIE, 1965).

Aufgrund der in Kapitel 3.4. beschriebenen Versuchsergebnisse könnten Membranfunktionsunterschiede bei den Stämmen in Erwägung gezogen werden. Welche Membranbestandteile eine Veränderung erfahren haben könnten, ist unklar. RANK und Mitarbeiter (1977) berichteten über eine Genmutation, die gleichzeitig die spezifische Plasmamembran-gebundene und Mitochondrienmembran-gebundene ATPase-Aktivität um ein Vielfaches verringert, wodurch die Mutanten in einen energieärmeren Zustand versetzt werden. Das hat in vielen Fällen Auswirkungen auf die Membranbindung von inaktivierenden und rho^--Mutationen-induzierenden Substanzen, die einen energiereichen Membranzustand erfordern (AZZI et al., 1969; GILTER et al., 1969; BASTOS and MAHLER, 1974).

Ein energiereicher Zustand der äußeren Membran wäre für Stamm 211-1 aM denkbar, da durch die höhere Wachstumsrate der Zellen auch ein energieabhängiger beschleunigter Stofftransport erfolgen sollte.

In diesem Zusammenhang müssen auch die in Kapitel 4.3. bereits angesprochenen mitochondrialen Membranfunktionsunterschiede zwischen den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM noch einmal diskutiert werden.

Es soll zuvor darauf hingewiesen werden, daß das cytoplasmatisch vererbbare Mitochondrium in vielen Funktionen vom Zellkern gesteuert wird. Das mitochondriale Genom enthält nur wenig Gene, die für maximal 13 mitochondriale Proteine mit bekannter und noch unbekannter Funktion codieren (FOX, 1981; GRIVELL, 1983). Da sich aber das Mitochondrium auch bei vollkommenem Verlust seiner mitochondrialen DNA vermehren kann, bedeutet das, daß alle anderen mitochondrialen Genprodukte z.B. zum Aufbau mitochondrialer Membranen vom Kern codiert werden (NAGLEY and LINNANE, 1970). Eine Modifizierung mitochondrialer Membranen auf molekularer Ebene, die zu Permeabilitätsveränderungen führt, wäre demnach eine genetische Variation infolge einer nuklearen Genmutation.

Ein energiereicher Zustand mitochondrialer Membranen steht im engen Zusammenhang mit einem erhöhten Atmungsstoffwechsel und einer beschleunigten Wachstumsrate. Unter der Voraussetzung, daß bei den Stämmen 235-11 c und 211-1 aM ebenfalls eine vom Energiezustand der Membranen abhängige Substanzbindung erfolgt, würde das bedeuten, daß die mitochondriale Bindungskapazität für den inaktivierenden Farbstoff bei Stamm 211-1 aM erhöht und bei Stamm 235-11 c erniedrigt sein müßte. Das wiederum sollte zu Variationen des innermitochondrialen Farbstoffgehalts führen sowie zu einer unterschiedlichen Schadenssetzung.

Plasmamembran- oder Mitochondrienmembran-gebundene Enzyme, die spezifische Membranfunktionen steuern, können in ihren Untereinheiten von verschiedenen Genen codiert werden. So können Mutationen an unterschiedlichen Genorten die Funktion eines Proteins beeinflussen. Die Wirkung einer Mutation auf

die Aktivität eines Enzyms hängt im allgemeinen davon ab, welcher Teil bzw. welche Untereinheit mutativ verändert wurde. Auf diese Weise kann es zu einem geringen, mittleren oder gesamten Aktivitätsverlust des betreffenden Enzyms kommen.

Wie schon ANDERSON und ROTH (1983) eine mehr-genige Kontrolle der TP-Sensibilität eines Stammes zur Diskussion stellten, so deuten auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse genetischer Analysen auf eine Beteiligung mehrerer Gene bei der Ausbildung des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens hin, wie die aus der Kreuzung hervorgegangenen unterschiedlich sensiblen Rekombinantentypen zu beweisen scheinen. Denkbar wäre die Ausprägung der photodynamischen Resistenz von Stamm 235-11 c als Folge mehrerer Genmutationen an unterschiedlichen Genorten, deren Genprodukte an der Bildung eines Zellbestandteils, z.B. eines Enzyms, beteiligt sind, das in seinem aktiven Zustand photodynamische Sensibilität beim Wildtyp 211-1 aM bewirkt. Hierbei könnte es sich durchaus um Untereinheiten eines Membranbestandteils handeln, der die Membranpermeabilität und/oder Bindungskapazität für den inaktivierenden Farbstoff reguliert.

Rekombinanten, die aus einer Kreuzung zwischen resistenter Mutante und sensiblem Wildtyp hervorgehen, könnten dann das entsprechende Enzym mit unterschiedlichem Aktivitätsgrad ausbilden, was die photodynamische Inaktivierungsrate der einzelnen Sporenkulturen in spezifischer Weise beeinflussen müßte.

Die oben aufgestellte Hypothese, die die photodynamische Resistenz des Stammes 235-11 c als genetisch bedingten Funktionsverlust eines Zellbestandteils beschreibt, befindet sich in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kreuzungsexperimente (siehe Kapitel 3.4.4.), die einen dominanten Erbgang photodynamischer Sensibilität aufzeigen sowie eine unterschiedliche photodynamische Sensibilität der isolierten

rekombinanten Sporenkulturen zu erkennen geben. Das Fehlen eines resistenten Elterntyps unter den photodynamisch behandelten Sporenkulturen liegt offensichtlich an der begrenzten Anzahl isolierter und auf ihre Sensibilität hin untersuchten Sporenkulturen.

4.4.2. Photodynamische Sensibilitätsunterschiede zwischen strahlenresistenten RAD- und strahlensensiblen rad-Stämmen

a) Photodynamische Inaktivierung

Die Frage, inwieweit bestimmte genetisch gesteuerte Reparatursysteme an der Beseitigung photodynamischer Schäden beteiligt sind, sollte anhang eines nach photodynamischer Behandlung durchgeführten Sensibilitätsvergleichs eines strahlenresistenten Wildtyps (235-11 c RAD) und zweier strahlensensibler Mutanten (2121-140 rad 9-4 und 2105-15 rad 2-20) geklärt werden. Da sich die obengenannten isogenen Stämme nur durch eine Mutation in den Reparaturgenen RAD 9 und RAD 2 unterscheiden, sollten Sensibilitätsunterschiede nach photodynamischer Behandlung mit TP als eine Folge dieser Strahlensensibilität-verursachenden Mutation gewertet werden.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und in Kapitel 3.4.5. beschriebenen Versuche konnte bewiesen werden, daß die Sensibilität gegenüber dem PDE bei strahlensensiblen Mutanten gegenüber dem strahlenresistenzen Wildtyp erhöht ist, und zwar in der Folge rad 2 > rad 9 > RAD (siehe Abb. 29). Ähnliche Ergebnisse erzielte man nach photodynamischer Behandlung von strahlenresistenten RAD- und strahlensensiblen rad 2- und rad 9-Stämmen mit dem in der PUVA-Therapie angewandten Photosensibilisator 8-MOP. Auch hier zeigt die Excisionsreparatur defekte rad 2-Mutante die höhere Sensibilität (AVERBECK and MOUSTACCHI, 1975; AVERBECK and AVERBECK, 1978). Offensichtlich bewirkt der genetische Defekt des rad 2-Stammes, keine Schnitte an veränderte Stellen der DNA setzen zu können, die beachtliche

Sensibilitätserhöhung gegenüber dem PDE. Das könnte bedeuten, daß photodynamische Schäden an der DNA, die in Gegenwart von Thiopyronin erzeugt worden sind, von den gleichen Endonukleasen erkannt und herausgeschnitten werden, die an der Excisionsreparatur von Strahlenschäden beteiligt sind. Für diese Annahme sprechen ebenfalls die Ergebnisse von MAGANA-SCHWENCKE et al. (1982) und von MILLER et al. (1982). Diese konnten auf biochemischem Wege nachweisen, daß alle von ihnen untersuchten rad-Mutanten, die defekt im Herausschneiden von UV-induzierten Pyrimidindimeren sind, gleichzeitig eine erhöhte Sensibilität gegenüber dem PDE mit einem Psoralen aufwiesen. Die Sensibilitätserhöhung konnte nachweislich darauf zurückgeführt werden, daß bei diesen Mutanten keine oder nur eine geringe Anzahl von Schnitten an photodynamisch geschädigter DNA zur Herauslösung von DNA-Cross links gesetzt wurden, im Gegensatz zum RAD-Wildtyp, bei dem nahezu alle photodynamisch induzierten DNA-Cross links beseitigt wurden.

Im Vergleich zum Wildtyp (RAD) weist die rad 2-Mutante nach photodynamischer Behandlung und nach Röntgenbestrahlung eine mittlere Sensibilität auf, während sie nach UV-Bestrahluqg hochsensibel wird (siehe Abb. 30). Das könnte folgende Gründe haben: Da in TP-sensibilisierten Zellen häufig Einzelstrangbrüche gesetzt werden (TRIEBEL et al., 1978; BERG et al., 1978), für deren Reparatur eine Endonuklease unnötig ist, wirkt sich das Fehlen des RAD 2-Genprodukts bei photodynamisch behandelten Zellen weniger letal aus als bei UV-bestrahlten Zellen, in denen überwiegend Thymidindimere entstehen, deren praereplikative Beseitigung einer Endonuklease bedarf. Auch Röntgenstrahlen induzieren in der Hauptsache die für eine rad 2-Mutante reparierbaren Einzelstrangbrüche.

Eine Mutation im RAD 9-Gen von Saccharomyces cerevisiae bewirkt ebenfalls eine Sensibilitätszunahme gegenüber dem PDE, so daß ebenfalls auf eine Beteiligung postreplikativer Reparaturprozesse an der Beseitigung photodynamischer Schäden ge-

schlossen werden kann. Die geringere Sensibilität der rad 9-Mutanten, verglichen mit dem rad 2-Stamm, könnte gleichzeitig als Beweis für die Vorrangstellung des Excisions-Reparatur-Systems bei der Reparatur einer Vielzahl photodynamischer Schäden in der Zelle gelten.

b) Photodynamische Mutationsauslösung

Die Art und Weise, in der geschädigte DNA repariert wird, beeinflußt sowohl die Überlebensrate eines Stammes als auch die Mutationsauslösung. Bei der enzymatisch gesteuerten Reparatur von Strahlenschäden an der DNA können Fehler entstehen, die die Ursache der UV- oder Röntgen-induzierten Mutagenese bilden. Der Zusammenhang zwischen Reparaturdefekt und Mutationsauslösung bei einem Stamm ist allgemein bekannt (siehe z.B. WITKIN, 1976; ERRERA, 1977). So zeigen Excisionsreparatur-defekte Mutanten nach UV- oder Röntgenbestrahlung infolge fehlerhaft reparierter Strahlenschäden normalerweise eine stark erhöhte Mutationsrate, während die Mutationsauslösung bei Rekombinationsreparatur-defekten Mutanten herabgesetzt ist.

Inzwischen konnte gezeigt werden, daß nicht nur UV- und Röntgenbestrahlung bei bestimmten reparaturdefekten strahlensensiblen E.coli- und Hefestämmen zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Mutationsrate führen, sondern ebenso die Behandlung mit bestimmten Chemikalien (PRAKASH, 1974, 1976; RUHLAND and BRENDEL, 1979) oder photodynamisch wirksamen Farbstoffen (HENRIQUES and MOUSTACCHI, 1980 a). Entsprechend der UV-induzierten Mutationsauslösung zeigen bestimmte Excisionsreparaturdefekte E.coli-Stämme nach photodynamischer Behandlung mit Acridin-Orange (AO) oder Methylenblau (MB) eine Erhöhung der Mutationsrate, während die photodynamische Mutanteninduktion bei Rekombinationsdefekten unterhalb der des Wildtyps liegt (HASS and WEBB, 1978; WEBB et al., 1979).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsversuche sollten darum zur weiteren Aufklärung photodynamischer Reparaturprozesse beitragen, verliefen jedoch zum großen Teil negativ. Wie schon in früheren Arbeiten mit strahlenresistenten Stämmen (LOCHMANN et al., 1964; MARQUARDT and v. LEAR, 1966), war auch bei diesen Versuchen die TP-induzierte photodynamische Mutationsauslösung äußerst gering (siehe Kapitel 3.4.6., Tabelle 10). Während jedoch die RAD-Stämme - weder der photodynamisch sensible Stamm 211-1 aM, noch der photodynamisch resistente Stamm 235-11 c - keine Erhöhung der Mutationsrate aufwiesen, führte die photodynamische Behandlung der strahlensensiblen rad-Stämme gelegentlich zu einer geringen Mutanteninduktion, so daß eine Reparatur photodynamischer DNA-Schäden nicht ganz auszuschließen ist. Eindeutige Unterschiede in der TP-induzierten photodynamischen Mutationsauslösung zwischen Stamm 2105-15 rad 2-20 und Stamm 2121-140 rad 9-4 sind jedoch nicht erkennbar. Nach Tabelle 10 zeigt rad 9 gegenüber rad 2 sogar eine geringfügig erhöhte Mutationsrate. Dieses Ergebnis befindet sich im krassen Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen, wonach Excisionsreparatur-defekte Mutanten gegenüber Rekombinationsreparatur-defekten Mutanten eine erhöhte Mutationsrate aufweisen sollten. Das kann einerseits der geringen Anzahl positiver Versuchsergebnisse zugeschrieben werden, andererseits aber auch als eine Besonderheit der TP- und Licht-induzierten Mutationsauslösung infolge eines abweichenden Reparaturverlaufs gewertet werden.

Neuere Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Acridin Orange und monochromatischem Licht an reparaturkompetenten und -defizienten Escherichia coli-Stämmen befanden sich ebenfalls im Kontrast zu früheren Ergebnissen. So zeigte der Endonuklease-defekte uvrA-Stamm nach photodynamischer Behandlung mit AO und 500 nm Bestrahlung eine stark erniedrigte Mutationsauslösung, die unterhalb der des Wildtyps lag, während der Rekombinationsreparatur-defekte recA-Stamm nach gleicher Behandlung unerwarteterweise die höchste Mutationsrate aufwies. Die photodynamische Behandlung der gleichen Stämme mit AO und 460 nm Bestrah-

lung führte dagegen zur Umkehrung der Ergebnisse (HASS and WEBB, 1979, 1982). Als Ursache hierfür wurden die unterschiedlichen photodynamischen DNA-Schäden wie Zerstörung von Guanin oder Desoxyribose, DNA-Protein-Cross links, Einzelstrangbrüche und unbekannte Schäden angeführt, die nach photodynamischer Behandlung mit AO und einer bestimmten Wellenlänge in unterschiedlichen Relationen zueinander auftreten sollten und mit unterschiedlicher Effektivität von den verschiedenen der Zelle zur Verfügung stehenden Reparatursystemen schadensspezifisch beseitigt werden. Dieses müßte zu einer gleichzeitigen Modifikation der Mutationsauslösung führen, abhängig davon, welcher überwiegend auftretende DNA-Schadenstyp gerade von dem für ihn zuständigen System repariert wird.

Danach sollen die durch AO und 500 nm erzeugten, nicht näher definierten Schäden vorwiegend durch das fehlerfrei arbeitende Rekombinations-Reparatur-System repariert werden und die durch AO und 460 nm hauptsächlich erzeugten Einzelstrangbrüche durch das fehlerhaft arbeitende Excisions-Reparatur-System (HASS and WEBB, 1982).

Da die Reparatur von Einzelstrangbrüchen keiner Endonuklease-funktion bedarf, sollten auch Endonuklease-defekte Mutanten in der Lage sein, diese Art von Schäden zu reparieren.

Bezogen auf die hier vorliegenden Ergebnisse der eigenen Mutationsversuche könnte das bedeuten, daß sich sowohl der Excisionsreparatur-defekte rad 2-20-Stamm als auch der Rekombinationsreparatur-defekte rad 9-4-Stamm des fehlerhaft arbeitenden Excisions-Reparatur-Systems zur Beseitigung TP-induzierter photodynamischer DNA-Einzelstrangbrüche bedienen könnten, wobei es bei beiden Stämmen zu einer etwa gleichen Mutationsauslösung kommen sollte. Die Fähigkeit des Endonuklease-kompetenten rad 9-Stamms, Schnitte zu setzen, könnte dazu führen, daß dieser im Verlauf der fehlerhaft arbeitenden praereplikativen Excisionsreparatur noch andere Schäden repariert, wobei weitere

Mutationen gesetzt werden könnten und sich gleichzeitig die Inaktivierungsrate reduziert. Eine anschließende fehlerfreie oder fehlerhafte postreplikative Reparatur photodynamischer Schäden muß diese Hypothese jedoch ausschließen, da diese die rad 2-spezifische Mutations- und/oder Inaktivierungsrate zusätzlich beeinflussen würde.

Gegen die oben diskutierte Annahme einer fehlerhaft ablaufenden praereplikativen Reparatur photodynamischer Schäden bei beiden rad-Stämmen spricht wiederum die Nicht-Mutagenität des strahlenresistenten RAD-Stammes 235-11 c. Dieser sollte bei Richtigkeit der Hypothese nach Induktion des fehlerhaften Excisions-Reparatur-Systems durch bestimmte photodynamische DNA-Läsionen ebenfalls eine gewisse, den rad-Stämmen vergleichbare, Erhöhung der Mutationsrate aufweisen.

Versuche, die zur Klärung photodynamischer Reparaturprozesse beitragen sollten, führten zur Isolierung und Charakterisierung bestimmter Psoralen-sensibler Saccharomyces-Mutanten und zur Aufklärung besonderer Reparaturschritte, die von einer neu identifizierten Genklasse, den sogenannten PSO-Genen, kontrolliert werden (HENRIQUES and MOUSTACCHI, 1980 b). Die Psoralen-Sensibilität beruht auf einer Mutation in einem PSO-Gen, dessen Genprodukt speziell an der Reparatur der durch Psoralen und Licht photoinduzierten DNA-Cross links beteiligt ist (MAGANA-SCHWENCKE et al., 1982). Alle PSO-Mutanten zeichnen sich durch eine reduzierte oder fehlende Mutagenität aus (CASSIER et al., 1980; CASSIER and MOUSTACCHI, 1981).

Dies zeigt eine gewisse Übereinstimmung zu den hier vorliegenden Ergebnissen, sofern man die geringe Anzahl positiv ausgefallener Mutationsexperimente als versuchsbedingte Schwankungen deutet. Unter dieser Voraussetzung ließe sich eine Korrelation zwischen RAD-Genprodukten und spezifischen Reparatur-Genprodukten für die Reparatur photodynamischer DNA-Schäden durch Thiopyronin diskutieren. So könnte die enzymatische Aktivität eines unbekannten Reparaturprodukts nach Mutation in

den Genen RAD 2 oder RAD 9 in unterschiedlichem Maße herabgesetzt sein. Aufgrund der Inaktivierungskurven in Abbildung 29 müßte die Reparaturkapazität des unbekannten Genprodukts beim rad 2-Stamm in höherem Maße gehemmt werden als beim rad 9-Stamm, wodurch sich das unterschiedliche Sensibilitätsverhalten der beiden rad-Stämme nach photodynamischer Behandlung erklären ließe.

Diese Deutung erlaubt auch eine Einbeziehung der Nicht-Mutagenität der strahlenresistenten und strahlensensiblen Stämme nach photodynamischer Behandlung mit TP. Da beide für das Mutationsgeschehen verantwortlichen Reparatursysteme wie Excisions-Reparatur-System und Rekombinations-Reparatur-System nach obiger Hypothese nur indirekt an der Reparatur photodynamischer Schäden beteiligt wären, bestände in diesem Fall auch kein zwingender Zusammenhang zwischen Reparaturdefekt und Mutationsauslösung bei den hier untersuchten Stämmen.

Fehlende Mutagenität nach Behandlung mit einer inaktivierenden Substanz bildet beim Wildtyp den Beweis für eine nicht genetische Schadenssetzung. Dies könnte auch auf die hier untersuchten rad-Stämme zutreffen. Unter der Voraussetzung, daß auch nicht-genetische Schäden von den zellulären Reparatursystemen erkannt und repariert werden, könnte die vom RAD-Wildtyp abweichende erhöhte photodynamische Sensibilität der reparaturdefekten Mutanten rad 2-20 und rad 9-4 auf eine verminderte Raparatur photodynamisch induzierter cytoplasmatischer TP-Schäden beruhen.

JACOB und HAMANN (1975) und JACOB (1977) konnten nachweisen, daß die nach photodynamischer Behandlung von Proteus mirabilis durch Methylenblau gesetzten Schäden an der DNA sowie an der Zellmembran mit gleicher Effektivität repariert werden, wobei die Reparatur der Membranschäden sogar mit wesentlich höherer Geschwindigkeit erfolgt als die der DNA-Schäden.

bb) Photodynamische Mutationsauslösung nach GM-Anzucht und bei Atmungsdefizienz

Von besonderem Interesse sind die Ergebnisse der Mutationsversuche nach Anzucht der Stämme auf Glycerinmedium und mit isogenen atmungsdefekten Mutanten. Erstaunlicherweise werden unter diesen Bedingungen bei allen Stämmen Mutationen zur Aminosäure-Prototrophie und z.T. auch Suppressormutationen gesetzt. Damit ist bewiesen, daß Umwelt- und cytogenetische Faktoren nicht nur auf das photodynamische Sensibilitätsverhalten eines Stammes modifizierend wirken, sondern auch einen erheblichen Einfluß auf das stammspezifische Mutationsverhalten ausüben. Während GM-Anzucht und Atmungsdefizienz allein keine mutationsauslösenden Faktoren darstellen, üben sie nach photodynamischer Behandlung der Stämme mit dem äußerst schwachen Mutagen Thiopyronin eine stimulierende Wirkung auf die Induktion von Genmutationen aus.

Die diesem auslösenden Effekt zugrundeliegenden zellulären Abläufe sind unklar und können darum nur als Hypothese gelten. Denkbar wäre eine umweltabhängige Modifikation wie sie bereits in Kapitel 4.2. diskutiert wurde, die den Kern beträfe. Eine Permeabilitätsänderung der Kernmembran könnte zu einer Anreicherung des photodynamisch aktiven Farbstoffs im Kern führen und dadurch einen Angriff des Photosensibilisators auf das nukleare Genom erleichtern. Hierbei könnte gleichzeitig ein co-mutagener Effekt entstehen wie ihn YIELDING et al. (1979) beschreiben. Danach müßte das in den Kern eingedrungene TP zunächst das Chromatin photodynamisch schädigen, wodurch bestimmte Genbereiche freigelegt und dem Farbstoff zugänglich gemacht werden würden. Auf diese Weise sollte die genetische Schadenssetzung erhöht werden und die Zahl letaler und mutativer Schäden zunehmen, was wiederum einen induzierenden Effekt auf bestimmte Schadenstyp-spezifische Reparatursysteme wie z.B. das bereits erwähnte PSO-Reparatursystem haben könnte. CASSIER und MOUSTACCHI (1981) konnten nachweisen, daß das PSO 3-1 Genprodukt Error-Prone-Aktivität besitzt und in der Lage ist, eine begrenzte Zahl photodynamisch induzierter Schäden zu reparieren.

Signifikante Unterschiede in der TP-induzierten photodynamischen Mutationsauslösung zwischen dem RAD Wildtyp und den rad-Stämmen lassen sich auch in diesem Fall nicht nachweisen, so daß auch für das umweltabhängige und cytogenetisch beeinflußte Mutationsverhalten das bereits unter b) Diskutierte gilt.

Dagegen macht sich ein Einfluß der rad-Gene durch unterschiedliche Induzierbarkeit von Adenin- und Lysin-Prototrophie sowie Suppressormutationen bemerkbar (siehe Kapitel 3.5., Tabelle 13). Während sich bei Stamm 235-11 c das lys 2-1-Gen gegenüber ade 2-1 durch eine erhöhte Mutabilität auszeichnet, ist beim rad 2-Stamm nach GM-Anzucht der ade-2-1-Genort gegenüber photodynamischer Mutationsauslösung sensibel. Die rad 2-20 Mutante weist außerdem als einzige eine Suppressormutationsrate auf, die über der Locusmutationsrate liegt.

Diese Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche Reparierbarkeit der photodynamisch induzierten Schäden hin oder auf eine unterschiedliche photodynamische Schadenssetzung bei den Stämmen. So könnten die in den drei Genbereichen (ade 2, lys 2, Suppressorgenbereich) gebildeten Schadenstypen von verschiedenen Reparatursystemen erkannt und repariert werden, wobei die Stämme 235-11 c und 2121-140 die im ade-Genbereich induzierten Schäden größtenteils fehlerfrei reparieren, die Schäden im lys-Genbereich dagegen einer fehlerhaften Reparatur unterliegen. Die Excisions-Reparatur-defekte rad 2-Mutante kann sich natürlich nur eines fehlerhaften Reparatursystems bedienen, so daß in allen Genorten Mutationen zur Aminosäure-Prototrophie oder zur Supersuppression gesetzt werden.

Denkbar wäre auch eine unterschiedliche Schadenssetzung nach photodynamischer Schädigung verschiedener chromosomaler Bereiche bei den Stämmen, so daß die betreffenden Genbereiche dem Angriff des Farbstoffs in höherem oder geringerem Maße oder auch gar nicht ausgeliefert sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde die modifizierende Wirkung von A) Umwelt, B) Cytoplasma und C) Genom auf die photodynamische Inaktivierung und Mutationsauslösung bei vier reparaturkompetenten und -defizienten Saccharomyces-Stämmen, die sich unter Standard-Versuchsbedingungen in ihrer photodynamischen Sensibilisierbarkeit unterscheiden.

- Es zeigt Stamm 235-11 c (RAD) eine geringe Sensibilität gegenüber dem PDE;

- Stamm 211-1 aM (RAD) erweist sich als äußerst sensibel nach photodynamischer Behandlung.

- Die rad-Stämme 2121-140(rad 9-4) und 2105-15 (rad 2-20) zeichnen sich durch eine mittlere Sensibilität aus, wobei die Excisionsreparatur-defekte rad 2-Mutante etwas sensibler ist.

A) Eine umweltabhängige Einflußnahme wurde durch Variation der Vorkulturbedingungen erzielt. Es wurden die Stämme auf

   - Medien mit unterschiedlicher Glucosekonzentration (0,25 - 4 %),

   - Medien mit verschiedenen Kohlehydratquellen (Saccharose, Lactose, Maltose),

   - nicht fermentierbarem Glycerinmedium und

   - unter anaeroben Wachstumsbedingungen

   angezogen und einer standardisierten photodynamischen Behandlung mit Thiopyronin als Sensibilisator unterzogen.

Es konnte gezeigt werden, daß bei allen Stämmen nach Anzucht unter modifizierten Wachstumsbedingungen erhebliche Schwankungen im photodynamischen Sensibilitätsverhalten auftreten. Dabei werden stammabhängig sowohl Sensibilitätserhöhungen als auch Resistenzzugewinne induziert. Die Einflußnahme der Vorkultur auf die photodynamische Sensibilität eines Stammes äußert sich in charakteristischer Weise. So führt Verringerung des Glucosegehalts bei allen Stämmen gleichermaßen zu einer Sensibilitätserhöhung, die konzentrationsabhängig ist. Die gleiche sensibilitätserhöhende Wirkung hat für alle Stämme eine Anzucht auf Glycerinmedium. Dagegen ist der Einfluß von verschiedenen Kohlehydraten auf die Oberlebensrate der Stämme unspezifischer Natur und macht sich bei den einzelnen Stämmen auf unterschiedliche Art bemerkbar, ebenso wie die Anzucht der Stämme unter anaeroben Bedingungen, die bei zwei Stämmen (211-1 aM und 2105-15) zu einem Resistenzgewinn und bei zwei Stämmen (235-11 c und 2121-140) zu einer Sensibilitätserhöhung führt.

Auch eine Abhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung vom pH-Wert des Suspensionspuffers konnte nachgewiesen werden.

Mutationsexperimente unter Standard-Vorkulturbedingungen und modifizierten Wachstumsbedingungen hatten zum Ergebnis, daß auch die mutationsauslösende Wirkung von TP und Licht nach Anzucht der Stämme auf Glycerinmedium stimuliert werden kann, so daß bei drei Stämmen (235-11 c, 2121-140, 2105-15) nach photodynamischer Behandlung mit TP genspezifisch Mutationen zur Aminosäure-Prototrophie und Suppressormutationen gesetzt werden.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur umweltabhängigen Einflußnahme auf die stammspezifische Oberlebens- und Mutationsrate nach photodynamischer Behandlung deuten darauf hin, daß Anzucht unter Derepressionsbedingungen eine Sen-

sibilitätserhöhung gegenüber photodynamischer Behandlung bewirkt und Anzucht unter Repressionsbedingungen diesbezüglich zu einem Resistenzgewinn führen kann.

Mehrere Hypothesen über physiologische und morphologische Änderungen in der Zelle unter Derepressions- und Repressionsbedingungen und deren modifizierender Einfluß auf Farbstoffbindung und -konzentrierung werden diskutiert.

Die Untersuchungen zeigen außerdem, daß die Beeinflussung des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens durch umweltabhängige Faktoren um so geringer ist, je sensibler sich der Stamm gegenüber dem PDE unter Standard-Versuchsbedingungen verhält.

B) Der Einfluß cytogenetischer Faktoren auf das stammspezifische photodynamische Sensibilitätsverhalten wurde mit Hilfe isogener spontaner sowie TP-induzierter rho^--Mutanten untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse bilden einen Beweis für die Abhängigkeit der photodynamischen Sensibilisierung eines Stammes von bestimmten cytogenetischen Faktoren (rho-Faktor), die die Atmungsfähigkeit einer Zelle kontrollieren und die an die cytoplasmatischen Mitochondrien gebunden sind.

Im Gegensatz zu bisherigen Forschungsergebnissen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Atmungsdefizienz bei spontanen oder TP-induzierten cytoplasmatischen rho^--Mutanten stammabhängig sowohl zu einem Resistenzgewinn als auch zu einer Sensibilitätserhöhung gegenüber dem PDE führen kann. Es liegt der Schluß nahe, daß die Einführung des rho-Faktors bei den Stämmen, die sich unter Standard-Versuchsbedingungen durch eine erhöhte photodynamische Sensibilisierbarkeit ausweisen (211-1 aM, 2105-15), zu einem Resistenzgewinn führt. Umgekehrt bewirkt Atmungsdefizienz

bei photodynamisch resistenten Stämmen eine Sensibilitätszunahme (235-11 c, 2121-140).

Unterschiede im Sensibilitätsverhalten bei spontanen und induzierten Atmungsdefekten treten nur bei den rad-Stämmen auf und könnten darum an den Reparaturdefekt gebunden sein.

Der photodynamische Angriff des Farbstoffs auf die Mitochondrien bzw. auf das mitochondriale Genom wurde indirekt durch die Bestimmung der rho^--Induktionsrate nachgewiesen.

Als Ursache des unterschiedlichen Sensibilitätsverhaltens von isogenen rho^+- und rho^--Stämmen nach photodynamischer Behandlung wurde die Möglichkeit einer mitochondrialen Konzentrierung der photodynamisch wirksamen Farbstoffmenge mit unterschiedlicher Wirkung auf die atmungsdefiziente und atmungskompetente Zelle diskutiert.

Auch eine modifizierende Wirkung des rho-Faktors auf die nukleare Mutationsauslösung nach photodynamischer Behandlung mit TP konnte nachgewiesen werden.

c) Unterschiede im photodynamischen Sensibilitätsverhalten der Stämme unter Standard-Versuchsbedingungen sind abhängig vom Genotyp. Um nähere Informationen über den genetisch gesteuerten Sensibilisierungsmechanismus zu erhalten, wurden genetische Analysen, Sensibilitätsvergleiche zwischen reparaturkompetenten und -defizienten Stämmen sowie Mutationsversuche durchgeführt.

Die Kreuzung des sensiblen Stammes 211-1 aM mit dem resistenten Stamm 235-11 c und eine anschließende Analyse des photodynamischen Sensibilitätsverhaltens der isolierten Sporenkulturen weist auf mehrere resistenzverursachende

Genmutationen bei Stamm 235-11 c mit rezessivem, mendelnden Erbgang hin. Bei der Diskussion um die mutativ veränderten Genprodukte werden Membranproteine wie Strukturproteine, Porenproteine oder membrangebundene Enzyme angeführt, die Einfluß auf die Farbstoffaufnahme oder -bindung haben.

Ein Vergleich des photodynamischen Sensibilitäts- und Mutationsverhaltens zwischen den isogenen reparaturdefekten rad-Stämmen und dem Wildtyp bringt nur wenige Hinweise für eine Beteiligung der bekannten Reparatursysteme wie Excisions-Reparatur-System oder Postreplikations-System an der Beseitigung photodynamisch induzierter Schäden. Obwohl sich die gegenüber rad 9 erhöhte photodynamische Sensibilität der rad 2-Mutante in guter Obereinstimmung zu ihrem Excisions-Reparatur-Defekt befindet, sind die Ergebnisse der Mutationsexperimente nicht eindeutig und geben Anlaß zu unterschiedlichen Hypothesen.

Am wahrscheinlichsten scheint

a) die Reparatur photodynamischer Schäden durch ein induziertes, fehlerhaft arbeitendes Excisions-Reparatur-System bei allen Stämmen, wobei der rad 2-Stamm ausschließlich Einzelstrangbrüche repariert, oder

b) die unterschiedliche Hemmwirkung des mutierten rad 9- und rad 2-Genbereichs auf ein unbekanntes schadenspezifisches Reparaturgenprodukt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALLISON, A., MAGNUS, I.A., and YOUNG, M.R.: Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization. - Nature 209, 874 - 878 (1966)

ANDERSON, J.M. and ROTH, R.M.: Photosensitivity of thiopyronine-resistent yeast mutants. - J. Gen. Microbiol. 129, 63 - 73 (1983)

AVERBECK, D.: Isolierung und Charakterisierung von drei UV-sensiblen Saccharomyces-Mutanten. - Dissertation, Freie Universität Berlin (1970)

AVERBECK, D., CHANRDA, P., and BISWAS, R.K.: Structural specifity in the lethal and mutagenic activity of furocoumarins in yeast cells. - Rad. Environm. Biophys. 12, 241 - 252 (1975)

AVERBECK, D. and MOUSTACCHI, E.: 8-methoxypsoralen plus 365 nm light effects and repair in yeast. - Biochim. Biophys. Acta 395, 393 - 404 (1975)

AVERBECK, D. and AVERBECK, S.: Dose-rate-effects of 8-methoxypsoralen plus 365 nm irradiation on cell-killing in Saccharomyces cerevisiae. - Mutation Res. 50, 195 - 206 (1978)

AVERBECK, D., SISAGNI, E., MARQUET, J.P., VIGNY, P., and GABORIAU, F.: Photobiological activity in yeast of derivatives of psoralen substituted at the 3,4 and/or the 4,5 reaction site. - Photochem. Photobiol. 30, 547 - 555 (1979)

AZZI, A., CHANCE, B., RADDA, G.K., and LEE, C.P.: A fluorescent probe of energy dependent structure changes in fragmented membranes. - Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 612 - 619 (1969)

BALDACCI, G., ZAMAROCZY, M., and BERNARDI, G.: Excision sites in the GC-clusters of the mitochondrial genome of yeast. - FEBS-Letters 114, 234 - 236 (1980)

BASTOS, R.N. and MAHLER, H.R.: Molecular mechanisms of mitochondrial genetic activity. - Effects of ethidium bromide on the deoxyribonucleic acid and energetics of isolated mitochondria. - J. Biol. Chem. 249, 6617 - 6627 (1974)

BAUGH, P.J., PHILLIPS, G.O., and ARTHUR, J.C.: An electron spin resonance study of intermediates formed during photosensitized oxidation of alcohols. - J. Phys. Chem. 70, 3061 - 3069 (1966)

BERG, H. and JACOB, H.-F.: Biologische Wirkungen photochemischer Wasserstoffperoxydbildung. - 1. Mitt.: Cytotoxische Effekte von Anthrochinonsulfonsäuren in bestrahlten Suspensionen von Proteus vugaris. - Z. Naturforsch. 17 b, 306 - 309 (1962)

BERG, H., GOLLMICK, F.A., TRIEBEL, H., BAUER, E., HORN, G., FLEMMING, J., and KITTLER, L.: 218 - Redox processes during photodynamic damage of DNA. - I. Results optained by several physico-chemical methods. - Bioelectrochem. Bioenerg. 5, 335 - 346 (1978)

BERG, H.: 219 - Redox processes during photodynamic damage of DNA. - II. A new model for electron exchange and strand breaking. - Bioelectrochem. Bioenerg. 5, 347 - 356 (1978)

BERISH, Y. and BLAMIRE, R. and J.: Regulation of yeast mitochondrial DNA synthesis. - I. Analysis of a mutant conditionally deficient in mitochondrial DNA-metabolism. - Molec. gen. Genet. 156, 41 - 47 (1977)

BERNARDI, G.: The origin of replication of the mitochondrial genome of yeast. - Trends Biochem. Sci. (TIBS) 7, 404 - 408 (1982)

BERNARDI, G.: The petite mutation in yeast. - Trends Biochem. Sci. (TIBS) 4, 197 - 201 (1979)

BERNARDI, G. and BERNARDI, G.: Repeated sequences in the mitochondrial genome of yeast. - FEBS-Letters 115, 159 - 162 (1980)

BLEEG, H.S., LETH BAK, A., CHRISTIANSEN, C., SMITH, K.E., and STENDERUP, A.: Mitochondrial DNA and glucose repression in yeast. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 524 - 530 (1972)

BLUM, H.F.: Photodynamic action and diseases caused by light (1941). Revised edit. 1964, Hafner Publ. Comp., New York.

BÖHME, H. and WACKER, A.: Mutagenic activity of thiopyronine and methylenblue in combination with visible light. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 137 - 139 (1963)

BURNETT, J.W.: Acute gout secondary to psoriasis exacerbated by photochemotherapy. - Arch. Dermatol. 118, 211 (1982)

CARNEVALI, F., MORPURGO, G., and TECCE, G.: Cytoplasmatic DNA from petite colonies of saccharomyces cerevisiae: A hypothesis on the nature of the mutation. - Science 163, 1331 - 1333 (1969)

CASSIER, C. and MOUSTACCHI, E.: Mutagenesis induced by mono- and bifunctional alkylating agents in yeast mutants sensitive to photo-addition of furocoumarins (pso). - Mutation Res. 84, 37 - 47 (1981)

CASSIER, C., CHANET, R., HENRIQUES, J.A.P., and MOUSTACCHI, E.: The effects of three pso genes on induced mutagenesis: A novel class of mutationally defective yeast. - Genetics 96, 841 - 857 (1980)

CECH, T., PATHAK, M.A., and BISWAS, R.K.: An electron microscopic study of the photochemical cross-linking of DNA in guinea pig epidermis by psoralen derivatives. - Biochim. Biophys. Acta 562, 342 - 360 (1979)

CHAMBERS, R.W., and KEARNS, D.R.: Triplet state of some common photosensitizing dyes. - Photochem. Photobiol. 10, 215 - 219 (1969)

CHANDRA, P., and WACKER, A.: Photodynamic effects on the template activity of nucleic acids. - Z. Naturforsch. 21 b, 663 - 666 (1966)

CHANET, R., IZARD, C., and MOUSTACCHI, E.: Genetic effects of formaldehyde in yeast. - II. Influence of ploidy and mutations affecting radiosensitivity on its lethal effect. - Mutation Res. 35, 29 - 38 (1976)

CHRYSOCHOOS, J. and GROSSWEINER, L.I.: Flash photolysis of several aromatics by ultraviolet light and visible light in the presence of eosine Y. - Photochem. Photobiol.8, 193 - 208 (1968)

COX, S.G., BOBILLIER, Ch., and WHITTEN, D.G.: Photooxidation and singlet oxigen sensitization by protoporphyrin IX and its photooxidation products. - Photochem. Photobiol. 36, 401 - 407 (1982)

CLARK-WALKER, G.D., and LINNANE, A.W.: The biogenesis of mitochondria in saccharomyces cerevisiae. - A comparison between cytoplasmic respiratory deficient mutant yeast and chloramphenicol-inhibited wildtype cells. - J. Cell Biol. 34, 1 - 14 (1967)

DALL'ACQUA, F., MARCIANI, S., CIAVATTA, L., and RODIGHIERO, G.: Formation of inter-strand cross-linkings in the photoreactions between furocoumarins and DNA. - Z. Naturforsch. 26 b, 561 - 569 (1971)

DALL'ACQUA, F., MARCIANI, S., VEDALDI, D., and RODIGHIERO, H.: Formation of inter-strand cross-linkings on DNA of guinea pig skin after application of psoralen and irridiation at 365 nm. - FEBS Letters 27, 192 - 194 (1972)

DALL'ACQUA, F., TERBOJEVICH, M., MARCIANI, D., VEDALDI, D., and RECHER, M.: Investigation on the dark interaction between furocoumarins and DNA. - Chem. Biol. Interactions 21, 103 - 115 (1978)

DALL'ACQUA, F., MARCIANI, S., ZAMBON, F., and RODIGHIERO, G.: Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA. - Photochem. Photobiol. 29, 489 - 495 (1979)

DECUYPER, J., PIETTE, J., MERVILLE, M.P., CALBERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Possible photochemical intermediates for the photodynamic action of phenothiazine derivatives. - Arch. internat. Physiol. Biochim. 90, B 15 - B 16 (1982)

DEVIN, A.B., and KOLTOVAYA, N.A.: Nuclear mutations of yeast with reduced spontaneous mutability of mitochondrial genome. - Mutation Res. 91, 451 - 455 (1981)

DUBBELMAN, I.M.A.R., VAN STEVENINCK, A.L., and VAN STEVENINCK, J.: Hematoporphyrin-induced photooxidation and photodynamic cross-linking of nucleic acids and their constituents. - Biochim. Biophys. Acta 719, 47 - 52 (1982)

ECKARDT, F.: Spontane und UV-induzierte Mutabilität von drei UV-sensiblen Saccharomyces Mutanten. - Dissertation, Freie Universität Berlin (1974)

EMEIS, C.C., and GUTZ, H.: Eine einfache Technik zur Massenisolation von Hefesporen. - Z. Naturforsch. 13 b, 647 - 650

EPHRUSSI, B., DE MARGERIE-HOTTINGUER, ROMAN, H.: Suppressiveness: A new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. - Proc. N.A.S. 41m 1065 (1955)

ERRERA, M.: Role of DNA repair in mutagenesis and carcinogenesis. - Front. Matrix Biol. 4, 172 - 198 (1977)

FARBER, E.M.: Psoralen and ultraviolet A (PUVA) - a critique. - J. Am. Acad. Dermatol. 2, 342 - 344 (1980)

FAYE, G., and FUKUHARA, B. Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: Delections and repetitions of genes. - Biochemie 55, 779 - 792 (1973)

FAUGERON-FONTY, G., CULARD, F., BALDACCI, G., GOURSOT, R., PRUNELL, A., and BERNARDI, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. - VIII. The spontaneous cytoplasmic "petite" mutation. - J. Mol. Biol. 134, 493 - 537 (1979)

FOOTE, Ch., WEXLER, S., and ANDO, W.: Chemistry of singlet oxigen. - III. Product selectivity. - Tetrahedron Letters 46, 4111 - 4118 (1965)

FOX, T.D.: More surprise from mitochondria. - Nature 292, 109 - 110 (1981)

GARDELLA, R.S., MAC QUILLAN, A.M.: Ethidium bromide mutagenesis in saccharomyces cerevisiae:Modulation by growth medium components. - Mutation Res. 46, 269 - 284 (1977)

GEISSLER, E.: Untersuchungen über die Irreparabilität photodynamischer Schäden. - Studia Biophysica 2, 95 - 102 (1967)

GILTER, C., RUBALCAVA, B., and CASWELL, A.: Fluorescent changes of ethidium bromide on binding to erythrocyte and mitochondrial membranes. - Biochim. Biophys. Acta 193, 479 - 481 (1969)

GLAD, B.W., and SPIKES, J.D.: Quantum yield studies of the dye-sensitized photoinactivation of trypsin. - Radiat. Res. 27, 237 - 249 (1966)

GOLDRING, S.E., GROSSMAN, L.I., KRUPNICK, D., CRYER, D.R., and MARMUR, J.: The petite mutation in yeast. - Loss of mitochondrial deoxyribinucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. - J. Mol. Biol. 52, 323 - 335 (1970)

GOLDTHWAITE, C.D., CRYER, D.R., and MARMUR, J.: Effect of carbon source on the replication and transmission of yeast mitochondrial genomes. - Mol. gen. Genet. 133, 87 - 104 (1974)

GOLLMICK, F.A., and BERG, H.: Sensibilisierte Photooxidation durch Methylenblau, Thiopyronin und Pyronin. - I. Mitteilung: Flash-Photooxidation von p-Diaminotoluol. - Photochem. Photobiol. 7, 471 - 475 (1968)

GOLLMICK, F.A., and BERG, H.: Sensibilisierte Photooxidation durch Methylenblau, Thiopyronin und Pyronin. - III. Mitteilung: Ober den Mechanismus der photosensibilisierten Oxidation des Guanosins durch Thiopyronin. - Photochem. Photobiol. 16, 447 - 453 (1972)

GOLLNICK, K., and SCHENCK, G.O.: Mechanism and stereoselectivity of photosensitized oxygen transfer reactions. - Pure Appl. Chem. 9, 507 - 525 (1964)

GOLLNICK, K., FRANKEN, T., SCHADE, G., and DÖRHÖFER, G.: Photosensitized oxigenation as a function of the triplet energy of sensitizers. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 89 - 105 (1970)

GRIVELL, L.A.: Die DNA der Mitochondrien. - Spektrum der Wissenschaft 5, 72 - 87 (1983)

GROSSWEINER, L.O.: Molecular mechanisms in photodynamic action. - Photochem. Photobiol. 10, 183 - 191 (1969)

GRUPPER, C., and BERRETTI, B.: Tar, ultraviolet light, PUVA and cancer. - J. Am. Acad. Dermatol. 3, 643 - 646 (1980)

HALL, R.M., NAGLEY, Ph., and LINNANE, A.W.: Biogenesis of mitochondria. - XLII. Genetic analysis of the control of cellular mitochondrial DNA levels in saccharomyces cerevisiae. - Mol. gen. Genet. 145, 169 - 175 (1976)

HALNAK, A., MORLIERE, P., and SANTUS, R.: Amplification of photodynamic effects by the synergistic action of UV-B and tryptophan. - Photochem. Photobiol. 37, 657 - 659 (1983)

HALPRIN, K.M.: Psoriasis, skin cancer and PUVA. - J. Am. Acad. Dermatol. 2, 334 - 337 (1980)

HASHIMOTO, K., KOHDA, H., KUMAKIRI, M., BLENDER, S.L., and WILLIS, I.: Psoralen-UVA-treated psoriatic lesions. - Arch. Dermatol. 114, 711 - 722 (1978)

HASS, B., WEBB, R.: Photodynamic effects of dyes on bacteria: I. Mutagenesis by acridine orange in the dark in excision- and recombination-deficient strains of escherchia coli. - Mutation Res. 51, 279 - 284 (1978)

HASS, B., and WEBB, R.: Photodynamic effects of dyes on bacteria: III. Mutagenesis by acridine orange and 500 nm monochromatic light in strains of escherichia coli that differ in repair capability. - Mutation Res. 60, 1 - 11 (1979)

HASS, B., and WEBB, R.: Photodynamic effects of dyes on bacteria: V. Mutagenesis by acridine orange and 460 nm or 500 nm light in strains of escherichia coli that differ in repair capability. - Mutation Res. 94, 39 - 51 (1982)

HAYNES, R.H., BAKER, R.M., and JONES, G.E.: Genetic implication of DNA-repair. - In: Energetics and Mechanisms in Radiation Biology. pp. 425 - 465, G.O. Philips (ed.), Academic Press, New York, London (1968)

HENRIQUES, J.A.P. and MOUSTACCHI, E.: Sensitivity to photoaddition of mono- and befunctional furocoumarins of x-ray-sensitive mutants of saccharomyces cerevisiae. - Photochem. Photobiol. 31, 555 - 562 (1980 a)

HENRIQUES, J.A.P. and MOUSTACCHI, E.: Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in saccharomyces cerevisiae. - Genetics 95, 273 - 288 (1980 b).

HEUDE, M., FUKUHARA, H., and MOUSTACCHI, E.: Spontaneous and induced rho mutants of saccharomyces cerevisiae: Patterns of loss of mitochondrial genetic markers. - J. Bacteriol. 139, 460 - 467 (1979)

HOUBA-HERIN, N., PIETTE, J., CALBERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Singlet-oxigen production by various dyes upon irridation with visible light. - Réunion De Mol. 13, B 109 (1981)

HOUBA-HERIN, N., CALBERG-BACQ, C.M., PIETTE, J. and VAN DE VORST, A.: Mechanisms for dye-mediated photodynamic action: Singlet oxigen production, deoxyguanosine oxidation and phage inactivating efficiencies. - Photochem. Photobiol. 36, 297 - 306 (1982)

HOUBA-HERIN, N., LOPEZ, M., CALBERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Photodynamic induction of single-stranded DNA lesions which stop the complementary chain synthesis. - Arch. Internat. Physiol. Biochim. 91, B 59 - B 60 (1983)

HOWARD-FLANDERS, P.: Notreparatur der DNA. - Spektrum der Wissenschaft 1, 56 - 65 (1982)

ITO, T.: Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: The $^1O_2$-hypothesis as a driving force in recent research. - Photochem. Photobiol. 28, 493 - 508 (1978)

ITO, T. and KOBAYASHI, K.: A survey of in vivo photodynamic activity of xanthenes, thiazines and acridines in yeast cells. - Photochem. Photobiol. 26, 581 - 587 (1977)

JACOB, H.E. and HAMANN, M.: Photodynamic alterations of the cell envelope of proteus mirabilis and their repair. - Photochem. Photobiol. 22, 237 - 241 (1975)

JACOB, H.E.: Photodynamically produced damages in proteus mirabilis and their repair. - Studia Biophysica 61, 129 - 134 (1977)

JAYARAMAN, J., COTMAN, C., MAHLER, H.R., and SHARP, C.: Biochemical correlates of respiratory deficiency. - VII. Glucose repression. - Arch. Biochem. Biophys. 116, 224 - 251 (1966)

JOLLOW, D., KELLERMANN, G.M., and LINNANE, A.W.: The biogenesis of mitochondria. - III. The lipid composition of aerobically and anaerobically grown saccharomyces cerevisiae as related to the membrane system of the cell. - J. Cell Biol. 37, 221 - 230 (1968)

JORI, G., and GAUZZO, G.: Proflavine-sensitized photooxidation of methionine. - Photochem. Photobiol. 12, 231 - 237 (1970)

JULIANI, M.H.S., HIXON, and MOUSTACCHI, E.: Mitochondrial genetic damage induced in yeast by a photoactivated furocoumarin in combination with ethidium bromide or ultraviolet light. - Mol. gen. Genet. 145, 249 (1976)

KEARNS, D.R.: Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. - Chem. Rev. 71, 395 - 427 (1971)

KENTER, D., and LASKOWSKI, W.: Induction of mutations by photodynamic action of thiopyronine in saccharomyces cerevisiae. - Radiat. Environm. Biophys. 15, 379 - 385 (1978)

KEPKA, A.G., and GROSSWEINER, L.I.: Photodynamic oxidation of iodide ion and aromatic amino acids by eosin. - Photochem. Photobiol. 14, 621 - 639 (1971)

KITTLER, L., and LÖBER, G.: On relationship between polarographic oxidation potentials and photodynamic activity of dyes. - Studia Biophysica 45, 175 - 182 (1974)

KNOWLES, A.: A mechanism for the methylene blue sensitized oxidation of nucleotides. - Photochem. Photobiol. 13, 473 - 487 (1971 a)

KNOWLES, A.: The flavin-sensitized photooxidation of nucleotides. II. The participation of the flavin triolet state. - Photochem. Photobiol. 13, 225 - 236 (1971 b)

KNOWLES, A., MAUTNER, G.N.: The flavin-sensitized photooxidation of nucleotides. - III. The participation of oxygen. - Photochem. Photobiol. 15, 199 - 207 (1972)

KOBAYASHI, K.: Effect of sodium azide on photodynamic induction of genetic changes in yeast. - Photochem. Photobiol. 28, 535 - 538 (1978)

KOLTOVAYA, N.A. and DEVIN, A.B.: Effect of mitochondrial mutations on the sensitivity of yeast cells to inactivation by nitrous acid. - Mutation Res. 105, 397 - 402 (1982)

KOWALSKI, S.: Herstellung und Charakterisierung von auxotrophstrahlensensiblen Saccharomyces-Stämmen. - Diplomarbeit, Freie Universität Berlin (1971)

KRAMER, H.E.A. and MAUTE, A.: Sensitized photooxygenation according to type 1 mechanism (radical mechanism) part 1. - Flash photolysis experiments. - Photochem. Photobiol. 15, 7 - 23 (1972)

LASKOWSKI, W.: Strahleninaktivierung von Saccharomyces in Abhängigkeit von Ploidiegrad und Genotyp. - Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. - Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesung II, 1961, Akademie-Verlag, Berlin (1962)

LASKOWSKI, W. and SCHÄDEL, U.: Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades. - X. Der AS-Effekt, ein Kurzzeitreparatur-Effekt. - Z. Naturforsch. 23 b, 1221 - 1226 (1968)

LASKOWSKI, W., LOCHMANN, E.R., JANNSEN, S., and FINK, E.: Zur Isolierung einer strahlensensiblen Saccharomyces-Mutante. - Biophysik 4, 233 - 242 (1968)

LASKOWSKI, W. and LEHMANN-BRAUNS, E.: Cross sensitivity to mono- and bifunctional alkylating agents of three radiation-sensitive saccharomyces mutants. - Biophysik 10, 51 - 59 (1973)

LASKOWSKI, W.: Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur. De Gruyter Verlag, Berlin - New York (1981)

LEDERBERG, J., and LEDERBERG, E.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. - J. Bacteriol. 63, 399 - 406 (1952)

LEY, R.D., GRUBE, D.P., and FRY, R.J.: Photosensitizing effects of 8-methoxypsoralen on the skin of hiarless mice. - I. Formation of interstrand cross-links in epidermal DNA. - Photochem. Photobiol. 25, 265 - 268 (1977)

LOCHMANN, E.R., STEIN, W., HAEFNER, K.: Die Wirkung von Thiopyronin auf Saccharomyces-Stämme verschiedenen Ploidiegrades auf Nucleinsäure-Komponenten in Gegenwart und Abwesenheit von sichtbarem Licht. - Z. Naturforsch. 19 b, 838 - 844 (1964)

LOCHMANN, E.R., and STEIN, W.: Kurzmitteilung: Zur Inaktivierung durch Thiopyronin mit und ohne Licht. - Naturwissenschaften 51, 59 (1964)

LOCHMANN, E.R., STEIN, W. and UMLAUF, Ch.: Über photodynamische Wirkung von Farbstoffen III. - Dunkelwirkung und photodynamischer Effekt von Farbstoffen auf Saccharomyces-Zellen verschiedenen Ploidiegrades und auf Nucleinsäuren. - Z. Naturforsch. 20 b, 778 - 785 (1965)

LOCHMANN, E.R., and STEIN, W.: Die Wirkung von Thiopyronin auf die Dunkelreaktivierung von UV-, Röntgen- und photodynamischen Schäden bei Saccharomyces. - Biophysik 5, 78 - 84 (1968)

LOCHMANN, E.R.: Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der photodynamischen Wirkung von Farbstoffen (6. Mitteilung). - Biophysik 3, 300 - 306 (1967)

LOCHMANN, E.R. and PIETSCH, I.: Hemmung der Proteinsynthese bei Saccharomyces-Zellen durch Farbstoffe in Gegenwart und in Abwesenheit von sichtbarem Licht. - Studia Biophysica 2, 431 - 434 (1967)

LOCHMANN, E.R. and MICHELER, A.: Binding of organic dyes to nucleic acids and the photodynamic effect. In: Physico-chemical Properties of Nucleic Acids, Vol. 1, pp. 223 - 265, J. Duchesne (ed.), Academic Press, London, New York (1973)

LOCHMANN, E.R., HERRMANN, C., PIETSCH, I., and MICHELER, A.: Verteilung von (^{3}H)-Thiopyronin in Hefezellen (Saccharomyces cerevisiae). - Z. Naturforsch. 31 c, 481 - 483 (1976)

LOCHMANN, E.R., PIETSCH, I., and SCHÖTZE, S.: Thiopyronine sensitized photodynamic effect on ribosome synthesis and ribosome content in saccharomyces cells. - Radiat. Environm. Biophys. 19, 181 - 186 (1981)

LOCHMANN, E.R., KÄUFER, N., SCHÖTZE, S., and KREUTZFELDT, Ch.: Thiopyronine-sensitized photodynamic effect on RNA synthesis in saccharomyces cells in vivo. - Int. J. Radiat. Biol. 40, 1 - 9 (1981)

LÖBER, G., and KITTLER, L.: Selected topics in photochemistry of nucleic acids. - Recent results and perspectives. - Photochem. Photobiol. 25, 215 - 233 (1976)

LUKINS, H.B., THAM, S.H., WALLACE, P.G. and LINNANE, W.: Correlation of membrane bound succinate dehydrogenase with the occurence of mitochondrial profiles in saccharomyces cerevisiae. - Biochim. Biophys. Res. Commun. 23, 363 - 369 (1966)

LUSENA, C.V., and JAMES, A.P.: Alterations in mitochondrial DNA of yeast which accompany genetically and environmentally controlled changes in mutability. - Mol. gen. Genet. 144, 119 - 125 (1976)

MAGANA-SCHWENCKE, N., HENRIQUES, A.P., CHANET, R., and MOUSTACCHI, E.: The fate of 8-methoxypsoralen photo-induced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: Comparison of wildtype and repair-deficient strains. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1722 - 1726 (1982)

MAHLER, H.R.: Biogenetic autonomy of mitochondria. - Critic. Rev. Biochem. 1, 381 - 460 (1973)

MAHLER, H.R., and BASTOS, R.N.: A novel reaction of mitochondrial DNA with ethidium. - FEBS Letters 39, 27 - 34 (1974)

MARCACCI, A.: Archo. ital. Biol. 9, 21 (1888)

MARMIROLI, N., RESTIVO, E.M., DONNINI, C., BIANCHI, L., PUGLISI, P.P.: Analysis of tho mutability in saccharomyces cerevisiae. - I. Effects of nmc and pet-ts alleles. - Mol. gen. Genet. 177, 581 - 588 (1980)

MARQUARDT, H., and von LAER, U.: Kurzmitteilung: Nicht-Mutagenität von Thiopyronin in einem Vorwärts- und Rückwärtsmutationssystem der Hefe. - Naturwissenschaften 53, 185 (1966)

MATHESON, I.B.C., ETHERIDGE, R.D., KRATOWICH, N.R., and LEE, J.: The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. - Photochem. Photobiol. 21, 165 - 171 (1975)

MATTICK, J.S., and NAGLEY, P.: Comparative studies of effects of acridines and other petite inducing drugs on the mitochondrial genome of saccharomyces cerevisiae. - Mol. gen. Genet. 152, 267 - 276 (1977)

Mc GLYNN, S.P., SMITH, F.J., and GILENTO, G.: Some aspects of the triplet state. - Photochem. Photobiol. 3, 269 - 294 (1964)

MEHROTRA, B.B., and MAHLER, H.R.: Characterization of some unusual DNAs from the mitochondria from certain "petite" strains of saccharomyces cerevisiae. - Arch. Biochem. Biophys. 128, 685 - 703 (1968)

MIAN, F.A., KOENZI, M., and HALVORSON, H.O.: Studies on mitochondrial membrane proteins in saccharomyces cerevisiae under different degrees of glucose repression. - J. Bateriol. 115, 876 - 881 (1973)

MICHELER, A., PIETSCH, I., and LOCHMANN, E.R.: Über die RNS-Synthese bei Saccharomyces-Zellen nach photodynamischer Behandlung und nach Röntgenbestrahlung. - Biophysik 10, 249 - 256 (1973)

MICHELER, A.: Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des photodynamischen Effekts. - Dissertation, Freie Universität Berlin (1972)

MILLER, R.D., PRAKASH, L., PRAKASH, S.: Genetic control of excision of saccharomyces cerevisiae interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near UV-light. - Mol. Cell Biol. 2, 939 - 948 (1982)

MOORE, D.E., and HEMMENS, V.: Photosensitization by antimalarial drugs. - Photochem. Photobiol. 36, 71 - 77 1982)

MORISON, W.L., WIMBERLY, J., PARRISH, J.A., and BLECH, K.J.: Abnormal lymphocyte function following long-term PUVA therapy for psoriasis. - Brit. J. Dermatol. 108, 445 - 450 (1983)

MOUSTACCHI, E.: Evidence for nucleus independent steps in control of repair of mitochondrial damage. - I. UV-induction of the cytoplasmic petite mutation in UV-sensitive nuclear mutants of saccharomyces cerevisiae. - Mo. gen. Genet. 114, 50 - 58 (1972)

MOUSTACCHI, E.: Cytoplasmic petite induction in recombination deficient mutants of saccharomyces cerevisiae. - J. Bacteriol. 115, 805 - 809 (1973)

NAGLEY, P., and LINNANE, A.W.: Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 989 - 996 (1970)

NAGLEY, P., and LINNANE, A.W.: Biogenesis of mitochondria. - XXI. Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast: The degenerative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain. - J. Mol. Biol. 66, 181 - 193 (1972)

NAKAI, S., and SAEKI, I.: Induction of mutation by photodynamic action in escherichia coli. - Genet. Res. 5, 158 - 161 (1964)

NISHIYAMA-WATANABE, S.: Photodynamic action of thiopyronine on the respiration and fermentation in yeast. - Int. J. Radiat. Biol. 30, 501 - 509 (1976)

NIHSIYAMA-WATANABE, S., and SCHULZ-HARDER, B.: Photodynamic action of thiopyronine on polyribosomes and cell-frei protein synthesis in yeast. - Int. J. Radiat. Biol. 31, 113 - 119 (1977)

PARRISH, J.A., FITZPATRICK, T.B., TANENBAUM, L., and PATHAK, M.A.: Photochemistry of psoriasis with oral methoxypsoroalen and longwave UV-light. - New England J. Med. 291, 1207 - 1211 (1974)

PARRY, J., and PARRY, E.: The effects of UV-light posttreatment on the survival characteristics of 21 UV-sensitive mutants of saccharomyces cerevisiae. - Mutation Res. 78, 545 - 556 (1969)

PERLMAN, P.S., and MAHLER, H.R.: Derepression of mitochondria and their enzymes in yeast: Regulatory aspects. - Arch. Biochem. Biophys. 162, 248 - 271 (1974)

PIETTE, J., CALBERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Proflavine mediated photoinactivation of bacteriophage ø x 174 and its isolated DNA: Effects of agents modifying various photochemical pathways. - Photochem. Photobiol. 26, 377 - 382 (1977)

PIETTE, J., CALBERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Photodynamic activity of dyes with different DNA binding properties. - II. T_4 phage inactivation. - Int. J. Radiat. Biol. 34, 223 - 232 (1978)

PIETTE, J., CLABERG-BACQ, C.M., and VAN DE VORST, A.: Alteration of guanine residues during proflavine mediated photosensitization of DNA. - Photochem. Photobiol. 33, 325 - 333 (1981)

PIETTE, J., and MOORE, P.D.: DNA synthesis on ø x 174 template damaged by proflavine and light treatment. - Photochem. Photobiol. 35, 705 - 708 (1982)

PINTO, M., GUERINEAU, M., and PAOLETTI, C.: Ethidium bromide mutagenesis in yeast: Protection by anaerobiosis. - Mutation Res. 30, 219 - 228 (1975)

POLAKIS, E.S., BARTLEY, W., and MEEK, G.A.: Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. - Biochem. J. 97, 298 - 302 (1965 a)

POLAKIS, E.S., and BARTLEY, W.: Changes in the enzyme activities of saccharomyces cerevisiae during aerobic growth on different carbon sources. - Biochem. J. 97, 284 - 297 (1965 b)

POLAKOWSKA, R., and PUTRAMENT, A.: Mitochondrial mutagenesis in saccharomyces cerevisiae. - V. Ethyl methanesulfonate. - Mutation Res. (1981)

PRAKASH, L.: Effect of genes controlling radiation sensitivity on chemically induced mutations in saccharomyces cerevisiae. - Genetics 83, 285 - 301 (1976)

PRAKASH, L.: Lack of chemically induced mutation in repair-deficient mutants of yeast. - Genetics 78, 1101 - 1118 (1974)

PRUNELL, A., and BERNARDI, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. - VI. Genome organization. - J. Mol. Biol. 110, 53 - 74 (1977)

PUGSLEY, P., LEE, D.R., and SCHNAITMAN, C.A.: Genes affecting the major outer membrane proteins of escherichia cole K-12: Mutants at nmpA and nmpB. - Mol. gen. Genet. 177, 681 - 690 (1980)

RAAB, O.: Z. Biol. 39, 524 (19oo)

RABEK, J.F., and RANBY, B.: The role of singlet oxygen in the photooxidation of polymers. - Photochem. Photobiol. 28 557 - 570 (1978)

RANK, G.H., ROBERTSON, A.J., and PHILLIPS, K.: Reduced plasma membrane permeability in a multiple cross-resistent strain of saccharomyces cerevisiae. - J. Bacteriol. 122, 359 - 366 (1975)

RANK, G.H., GERLACH, J.H., and ROBERTSON, A.J.: Some physiological alterations associated with pleiotropic cross-resistence and colateral sensitivity in saccharomyces cerevisiae. - Mol. gen. Genet. 144, 281 - 288 (1976)

RANK, G.H., ROBERTSON, A.J., and GERLACH, J.H.: Single gene alteration of plasma and mitochondrial membrane function in saccharomyces cerevisiae. - Mol. gen. Genet. 152, 13 - 18 (1977)

RESNICK, M.A., and SETLOW, J.K.: Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light. - J. Bacteriol. 109, 979 - 986 (1972)

RITCHIE, D.A.: The photodynamic action of proflavine an phage T4. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 720 - 726 (1965)

ROTH, R., PAPIERNIAK, K.J., and ANDERSON, J.M.: Mutations in saccharomyces cerevisiae affecting sensitivity to photodynamic inactivation. - Photochem. Photobiol. 27, 795 - 798

RUHLAND, A., and BRENDEL, M.: Mutagenesis by cytostatic alkylating agents in yeast strains of differing repair capacities. - Genetics 92, 83 - 97 (1979)

SANTAMARIA, L.: Recent contributions to cancer research in Italy. - Suppl. to Tumori, 167 - 287 (1960)

SCHÄDEL, U., and LASKOWSKI, W.: Umweltbedingte Variationen der Röntgenstrahlen-Resistenz einer Saccharomyces-Mutante. - Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 205, 54 - 62 (1967)

SCHENCK, G.: Mechanism of formation of singlet-oxygen in photosensitized oxigenation. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 67 - 78 (1970)

SCHENCK, G.O., and KOCH, E.: Zwischenreaktionen bei photosensibilisierten Prozessen in Lösungen. - Z. Elektrochem. 64, 170 - 177 (1960)

SCHOTZE, S.: The effect of photodynamic treatment with thiopyronine on yeast nDNA and mtDNA. - Radiat. Environm. Biophys. 21, 123 - 140 (1982)

SCOTT, B.R., PATHAK, M.A., and MOHN, G.R.: Molecular and genetic basis of furocoumarins reactions. - Mutation Res. 39, 29 - 74 (1976)

SHERMAN, F., and SLONIMSKI, P.P. Respiration deficient mutants of yeast II. - Biochim. Biophys. Acta 90, 1 - 15 (1964)

SHERMAN, F.: Respiration-deficient mutants of yeast I. - Genetics 48, 375 - 391 (1963)

SLATER, T.F., and RILEY, P.A.: Photosensitization and lysosomal damage. - Nature 209, 151 - 154 (1966)

SLONIMSKI, P.P.: La formation des enzymes respiratoires chez la levure. - Masson, Paris (1955)

SLONIMSKI, P.P., PERRODIN, G., and CROFT, J.H.: Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: Complete transformation of cells in respiratory deficient non-chromosomal petites. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 232 - 239 (1968)

SONG, P.S., and KURTIN.: The nature of the triplet states of flavins: A further study. - Photochem. Photobiol. 10, 211 - 214 (1969)

SONG, P.S., and TAPLEY, K.J.: Photochemistry and photobiology of psoralens. - Photochem. Photobiol. 29, 1177 - 1197 (1979)

SPIKES, J.D., and STRAIGHT, R.: Sensitized photochemical process in biological systems. - Ann. Rev. Phys. Chem. 18, 409 - 436 (1967)

SPIKES, J.D.: In: Photophysiolo,y Vol. 3, pp. 33 - 64, A.C. Giese (ed.), Academic Press, London, New York (1968)

SPIKES, J.D., and LIVINGSTONE, R.: In: Advances in Radiation Biology Vol. 3, pp. 29 - 121. - L.G. Augenstein, R. Mason, M. Zelle (eds.), Academic Press, London, New York (1969)

STERN, R.S., THIBODEAU, L.A., KLEINERMAN, R.A., PARRISH, J.A., FITZPATRICK, T.B., and 22 participating investigators: Risk of cutaneous carcinoma in patients treated with oral methoxsalen photochemotherapy for psoriasis. - N. Engl. J. Med. 300, 809 - 813 (1979)

STERN, R.S., ZIERLER, S., and PARRISH, J.A.: Psoriasis and the risk of cancer. - J. Invest. Dermatol. 78, 147 - 149 (1982)

STEVENS, B.J.: Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. - A study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution. - Biol. Cellulaire 28, 37 - 56 (1977)

STEVENS, B.J.: Variation in mitochondrial numbers and volume in yeast accoring to growth conditions. - J. Cell Biol. 63, 671 (1974)

TAPPEINER, H., VON JODLBAUER, A.: Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. - Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, Vogel, Leipzig (1907)

TRIEBEL, H., REINERT, K.E., BÄR, H., and GOLLMICK, F.A.: Photodynamically induced changes in the overall flexibility and molecular weight of double-stranded DNA. - Studia Biophysica 72, 31 - 38 (1978)

TRIEBEL, H., BÄR, H., JACOB, H.E., SARFERT, E., and BERG, H.: Sedimentation analysis of DNA photooxidized in the presence of thiopyronine. - Photochem. Photobiol. 28, 331 - 337 (1978)

WACKER, A., TORCK, G., and GERSTENBERGER, A.: Zum Wirkungsmechanismus photodynamischer Farbstoffe. - Naturwissenschaften 50, 377 (1963)

WALLACE, P.G., HUANG, M., and LINNANE, A.W.: The biogenesis of mitochondria. - II. The influence of medium composition on the cytology of anaerobically grown saccharomyces cerevisiae. - J. Cell Biol. 37 (1968)

WATERS, R., and MOUSTACCHI, E.: Excision of pyrimidine dimers from the nuclear DNA of a haploid respiratory deficient (rho^-) strain of saccharomyces cerevisiae. - Photochem. Photobiol. 21, 441 - 444 (1975)

WEBB, R., HASS, B., and KUBITSCHEK, H.: Photodynamic effects of dyes on bacteria. - II. Genetic effects of broad-spectrum visible light in the presence of acridine dyes and methylene blue in chemostat cultures of escherichia coli. - Mutation Res. 59, 1 - 13 (1979)

WEINSTEIN, G.D., WALESCO, J., and FROST, P.: In: Psoriasis, proceedings of the international symposium, Stanford, California, pp. 393 - 407. - F.M. Farber, A.J. Cox (eds.), Stanford University Press (1971)

WILLIAMSON, D.H., JOHNSTON, L.H., RICHMOND, K.M.V., and GAME, J.C.: Mitochondrial DNA and the heritable unit of the yeast mitochondrial genome: A review. In: Mitochondria, Genetics and Biogenesis of Mitochondria, Proceedings of a colloquium held in Schliersee, Germany, August 1977, pp. 1 - 24 . - W. Bandlow, R.J. Schweyen, K. Wolf, F. Kaudewitz (eds.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1977)

WITKIN, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in escherichia coli. - Bacteriol. Rev. 40, 869 - 907 (1976)

WOLF, K., FITZPATRICK, T.B., and PARRISH, J.A.: Photochemotherapy of psoriasis with oral 8-methoxypsoralen. - Arch. Dermatol. 112, 943 - 950 (1976)

YIELDING, L.W., BROWN, B.R., GRAVES, D.E., and YIELDING, L.: Ethidium bromide enhancement of frameshift mutagenesis caused by photoactivatable ethidium analogs. - Mutation Res. 63, 225 - 232 (1979)

YOUNG, A.R., and MAGNUS, I.A.: The sunburn cell in hairless mouse epidermis: Quantitative studies with UV-A radiation and mono- and bifunctional psoralens. - J. Invest. Dermatol. 79, 218 - 221 (1982)

YOUNG, A.R., and MAGNUS, I.A.: An action spectrum for 8-MOP induced sunburn cells in mammalian epidermis. - Brit. J. Dermatol. 104, 451 - 458 (1981)

ZAMAROCZY, M., MAROTTA, R., FAUGERON-FONTY, G., GOURSOT, R., MANGIN, M., BALDACCI, G., and BERNARDI, G.: The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. - Nature 292, 75 - 78 (1981)

ANERKENNUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Strahlenbiologie und Genetik angefertigt.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und Diskussionen danke ich insbesondere meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. W. Laskowski.

Lebenslauf

Name:	Ursula Zimny-Arndt, geb. Zimny
Geburtsdatum:	3. Februar 1951
Geburtsort:	Hannover
April 1958	Einschulung in die Pestalozzi-Grundschule in Hannover
1962 - 1967	Besuch des Realschulzweiges der Pestalozzi-Schule in Hannover
Juni 1967	Abschluß der Mittleren Reife, anschließender Besuch eines neusprachlichen und mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Hannover
3. 6. 1970	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
WS 1970/71	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Germanistik
WS 1971/72	Wechsel zum Fachbereich Biologie
24. 5. 1974	Vordiplom am Fachbereich Biologie
21. 10. 1977	Diplom in Allgemeiner Biologie und Genetik
Seit Mai 1980	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Sonderforschungsbereich Embryonalpharmakologie der Freien Universität Berlin, Klinikum Charlottenburg, im Projekt biochemische Genetik